

MAUREN ISFER ANGHEBEM OLIVEIRA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *Xba*I E *Eco*RI
DO GENE DA APOLIPOPROTEÍNA B COM A
DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA
E *DIABETES MELLITUS* TIPO 2**

CURITIBA

2005

MAUREN ISFER ANGHEBEM OLIVEIRA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *Xba*I E *Eco*RI DO GENE
DA APOLIPOPROTEÍNA B COM A DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA E *DIABETES MELLITUS* TIPO 2**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marileia Scartezini.
Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza.

CURITIBA

2005

*A você MARINA, minha filha linda,
que tem sido o impulso principal
de muitas das minhas realizações.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que tudo concede àqueles que seguem Seu maior desejo e ensinamento: AMAR aquilo que se faz, principalmente a vida.

Agradeço à minha família e amigos, pelo apoio, estímulo e compreensão nas muitas horas de ausência.

Agradeço aos meus orientadores, pelo “mostrar o caminho”.

Agradecimentos especiais à Prof.^a Dr.^a Marileia Scartezini, pela orientação, por ter viabilizado este trabalho, pela dedicação, e, principalmente, pelo vínculo de amizade formado durante estes dois anos.

Ao Prof. Geraldo Picheth, pelo incentivo em iniciar este mestrado. Agradeço por seu apoio e competência, e aproveitamento para externar minha admiração.

Ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza, pela prontidão e conselhos na co-orientação deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Eleidi Chautard Freire Maia e ao Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, do Departamento de Genética da UFPR, pela colaboração com as análises estatísticas.

À Caroline Luise Prochaska, pelo companheirismo, dedicação, e, principalmente, pela amizade. Aos demais colegas do mestrado, por todo o apoio.

Agradeço à minha querida amiga, Dr.^a Elsie Helena Martins Capp, pela amizade, apoio e carinho. E pelas conversas divertidas que aliviaram momentos de cansaço.

Ao meu chefe, Ten. Cel. Braga, pelo apoio e amizade, e pelas dispensas do trabalho concedidas para a realização deste mestrado.

Ao meu colega e amigo, Célio Luiz Banaszeski, pelo suporte, incentivo e colaboração durante toda nossa convivência profissional.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital da Polícia Militar do Paraná, pelo apoio.

À uma pessoa muito especial, Alessandro José Polli Oliveira, com quem dividi minha vida, conquistas e derrotas. Agradeço pelo amor incondicional, pela compreensão e apoio.

À minha avó, Nilse Sbaraini, por ter dedicado sua vida e seu amor na minha formação pessoal e profissional.

À minha mãe, que, com dedicação e amor, ensinou suas filhas a lutar pelos seus objetivos, mas sempre apoiando-se nos alicerces do bom caráter.

Aos meus pais, irmãos, tios e primos, que me ajudaram, apoiaram e sempre estiveram presentes em todas as conquistas da minha vida.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui a outra.
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós: leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada; há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada.
Esta é a maior responsabilidade da nossa vida e a prova evidente de que duas pessoas não se encontram ao acaso”.*

Antonie Saint Exupéry

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 2 |
| 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL | 2 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 2 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 3 |
| 3.1 APOLIPOPROTEÍNA B E SUAS VARIAÇÕES GENÉTICAS | 3 |
| 3.1.1 Polimorfismo <i>Xba</i> I do gene da apolipoproteína B | 5 |
| 3.1.2 Polimorfismo <i>Eco</i> RI do gene da apolipoproteína B | 8 |
| 3.2 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E <i>DIABETES MELLITUS</i> | 10 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 14 |
| 4.1 VARIÁVEIS ESTUDADAS | 15 |
| 4.1.1 Variáveis Antropométricas | 15 |
| 4.1.2 Parâmetros Bioquímicos | 15 |
| 4.2 REAGENTES | 16 |
| 4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA | 16 |
| 4.4 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS EXONS 26 E 29 DO GENE DA APO B PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 4.5 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO <i>Xba</i> I DO EXON 26 DO GENE DA APO B HUMANA | 20 |
| 4.6 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO <i>Eco</i> RI DO EXON 29 DO GENE DA APO B HUMANA..... | 21 |
| 4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA RESTRIÇÃO COM <i>Xba</i> I E <i>Eco</i> RI .. | 21 |
| 4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 23 |
| 5 RESULTADOS | 24 |
| 5.1 DADOS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS | 25 |
| 5.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE DA APO B | 27 |
| 5.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS E GENÓTIPOS DO GENE DA APO B E DAC NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE DM2 | 34 |
| 6 DISCUSSÃO | 37 |
| 6.1 VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS | 37 |
| 6.2 VARIABILIDADE GENÉTICA | 40 |
| 7 CONCLUSÕES | 46 |
| REFERÊNCIAS | 47 |
| ANEXOS | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|---|
| apo B | apolipoproteína B |
| AV | Amplitude de Variação |
| DAC | Doença Arterial Coronariana |
| DAC + | Presença de Doença Arterial Coronariana comprovada por coronarioangiografia |
| DAC – | Ausência de Doença Arterial Coronariana comprovada por coronarioangiografia |
| DM | <i>Diabetes mellitus</i> |
| DM2 – | Ausência de <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2 |
| DM2 + | Presença de <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2 |
| DP | Desvio Padrão |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| GL | Grau de Liberdade |
| HbA_{1c} | Hemoglobina Glicada A _{1c} |
| HDL-C | HDL-Colesterol |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| LDL | Lipoproteína LDL |
| LDL-C | LDL-Colesterol |
| M | Média |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| RFLP | Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição; <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> |
| SNP | Polimorfismo de Nucleotídeo Único; <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| TBE | Tampão Tris-Borato-EDTA |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| TABELA 1 | FREQUÊNCIAS (%) DOS ALELOS X ⁺ E X ⁻ DO POLIMORFISMO <i>Xba</i> I DO GENE DA APO B, EM CAUCASIANOS, ORIENTAIS E AFRICANOS, NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE DAC | 7 |
| TABELA 2 | FREQUÊNCIAS (%) DOS ALELOS E ⁺ E E ⁻ DO POLIMORFISMO <i>Eco</i> RI DO GENE DA APO B, EM CAUCASIANOS, ORIENTAIS E AFRICANOS, NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE DAC | 9 |
| TABELA 3 | CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS | 15 |
| TABELA 4 | MARCADORES BIOQUÍMICOS | 16 |
| TABELA 5 | CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS EXONS 26 E 29 DO GENE DA APO B HUMANA..... | 19 |
| TABELA 6 | PROGRAMA UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS EXONS 26 E 29 DO GENE DA APO B HUMANA | 20 |
| TABELA 7 | CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DO EXON 26 DO GENE DA APO B COM A ENZIMA <i>Xba</i> I | 20 |
| TABELA 8 | CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DO EXON 29 DO GENE DA APO B COM A ENZIMA <i>Eco</i> RI | 21 |
| TABELA 9 | DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS POR SEXO E FATORES DE RISCO PARA DAC NOS GRUPOS ESTUDADOS..... | 24 |
| TABELA 10 | VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS: DM2-DAC-, DM2-DAC+ E DM2+DAC+, COM MÉDIA (M) ± DESVIO PADRÃO (DP) E AMPLITUDE DE VARIAÇÃO (AV) DAS VARIÁVEIS ANALISADAS | 26 |
| TABELA 11 | FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS <i>Xba</i> I E <i>Eco</i> RI DO GENE DA APO B NOS GRUPOS DM2-DAC-(N=70), DM2-DAC+(N=70) E DM2+DAC+(N=70) E NA AMOSTRA (N=210) | 32 |
| TABELA 12 | FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS <i>Xba</i> I E <i>Eco</i> RI DO GENE DA APO B NOS GRUPOS DAC- (N=70) E DAC+ (N=140) | 33 |
| TABELA 13 | DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA (%) DOS GENÓTIPOS DO GENE DA APO B (<i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI) NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=70), DM2-DAC+ (N=70) E DM2+DAC+ (N=70)..... | 34 |

| | | |
|-----------|--|----|
| TABELA 14 | FREQÜÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DOS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DO GENE DA APO B (<i>XbaI/EcoRI</i>) NOS GRUPOS DM2–DAC– (N=70), DM2–DAC+ (N=70) E DM2+DAC+ (N=70)..... | 35 |
| TABELA 15 | DISTRIBUIÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS (%) DOS GENÓTIPOS X–X–/E+E+ E DEMAIS GENÓTIPOS <i>XbaI/EcoRI</i> DO GENE DA APO B NOS GRUPOS DM2–DAC– (N=70), DM2–DAC+ (N=70) E DM2+DAC+ (N=70)..... | 36 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 1 | Representação da apolipoproteína B-100 na lipoproteína de densidade baixa | 3 |
| Figura 2 | Representação esquemática do mapa do gene da apo B | 4 |
| Figura 3 | Processo de extração do DNA de sangue total | 17 |
| Figura 4 | Representação esquemática do fragmento do exon 26 amplificado e localização do polimorfismo <i>Xba</i>I do gene da apo B humana | 22 |
| Figura 5 | Representação esquemática do fragmento do exon 29 amplificado e localização do polimorfismo <i>Eco</i>RI do gene da apo B humana | 22 |
| Figura 6 | Distribuição de freqüência de idade | 25 |
| Figura 7 | Perfil eletroforético da PCR para amplificação do polimorfismo <i>Xba</i>I do exon 26 do gene da apo B | 28 |
| Figura 8 | Perfil eletroforético da PCR para amplificação do polimorfismo <i>Eco</i>RI do exon 29 do gene da apo B | 29 |
| Figura 9 | Perfil eletroforético típico da PCR-RFLP do polimorfismo <i>Xba</i>I do exon 26 do gene da apo B | 30 |
| Figura 10 | Perfil eletroforético típico da PCR-RFLP do polimorfismo <i>Eco</i>RI do exon 29 do gene da apo B | 31 |

RESUMO

A apolipoproteína B (apo B) é a única proteína da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e está envolvida no transporte e metabolismo do colesterol. Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) do gene da apo B humana têm sido associados ao risco para a Doença Arterial Coronariana (DAC). Uma amostra de 210 indivíduos submetidos à cineangiocoronariografia, foi classificada em 3 grupos iguais (N=70) caracterizados como DM2–DAC– (grupo controle), DM2–DAC+ (presença de DAC e ausência de *Diabetes mellitus* tipo 2) e DM2+DAC+ (presença de DAC e *Diabetes mellitus* tipo 2). A DAC foi definida como a presença de estenose maior que 50% em qualquer artéria coronária, e o diagnóstico do DM2 foi estabelecido pelos critérios da Associação Americana de Diabetes. A proporção homens/mulheres nos grupos foi: 33/37 (DM2–DAC–), 52/18 (DM2–DAC+) e 43/27 (DM2+DAC+). A idade média foi de 62 ± 10 anos nos três grupos. Foram analisadas as variáveis idade, sexo, tabagismo, pressão arterial sistólica e diastólica, índice de massa corporal, presença de hipertensão e história familiar para DAC, bem como as concentrações séricas do perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicérides), apolipoproteína A1 e B, glicemia e hemoglobina glicada. O grupo DM2+DAC+ apresentou concentrações séricas de triglicérides com médias superiores às do grupo controle ($P < 0,001$), e concentrações séricas de HDL-C com médias inferiores às do grupo controle ($P = 0,001$). Os polimorfismos *XbaI* (exon 26) e *EcoRI* (exon 29) do gene da apo B foram caracterizados por PCR-RFLP, sendo os fragmentos de DNA, após a restrição, identificados por eletroforese em agarose e corados com brometo de etídeo. As frequências genótípicas encontradas para o polimorfismo *XbaI* foram 0,171, 0,458 e 0,371 para o grupo DM2–DAC–; 0,214, 0,479 e 0,307 para o grupo DM2–DAC+; e 0,171, 0,386 e 0,443 para o grupo DM2+DAC+, respectivamente, para os genótipos X+X+, X+X– e X–X–. As frequências genótípicas encontradas para o polimorfismo *EcoRI* foram 0,728, 0,229 e 0,043 para o grupo DM2–DAC–; 0,657, 0,314 e 0,029 para o grupo DM2–DAC+; e 0,700, 0,257 e 0,043 para o grupo DM2+DAC+, respectivamente, para os genótipos E+E+, E+E– e E–E–. Não houve diferença significativa entre as frequências alélicas dos polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apo B ($P = 0,8331$ e $P = 0,5828$, respectivamente; Teste Exato de Fisher bidirecional) quando comparados os 3 grupos em estudo; nem entre as frequências genótípicas ($P = 0,9439$ e $P = 0,6701$, respectivamente; Teste Exato de Fisher bidirecional). A frequência do genótipo X–X–/E+E+ do polimorfismo *XbaI/EcoRI* do gene da apo B comparada à dos demais genótipos, mostrou diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 6,43$; $P = 0,0112$) entre os grupos DM2–DAC+ e DM2+DAC+, sendo mais freqüente neste último, validando o uso deste genótipo como marcador adicional de risco em estudos populacionais, para a DAC na presença de DM2.

Palavras-chave: Doença Arterial Coronariana, DAC, *Diabetes mellitus* tipo 2, apolipoproteína B, apo B, apo B-100, polimorfismo de único nucleotídeo, SNP, Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição, RFLP, *XbaI*, *EcoRI*.

ABSTRACT

Apolipoprotein B (apo B) is the only protein of the low density lipoprotein (LDL) and it is involved with the transportation and metabolism of the cholesterol. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the human apo B gene have been associated to risk of Coronary Artery Disease (CAD). 210 individuals submitted to cinecoronarography exam were divided in three groups (N=70) characterized as DM2–CAD– group (control group), DM2–CAD+ group (individuals with CAD and without type 2 *Diabetes mellitus*) and DM2+CAD+ group (individuals with CAD and type 2 *Diabetes mellitus*). CAD was defined as the presence of stenosis higher than 50% in any coronary artery, and the diagnostic of type 2 *Diabetes mellitus* (DM2) was established by the American Diabetes Association criteria. The ratio men/women in the groups were 33/37 (DM2–CAD–), 52/18 (DM2–CAD+) and 43/27 (DM2+CAD+). The median age was 62 ± 10 years for the three groups. The variables analyzed were age, sex, tobacco, systolic and diastolic arterial pressure, body mass index, hypertension, and family history for CAD. The plasmatic concentrations of the lipid profile (total cholesterol, HDL-C, LDL-C and triglycerides), apolipoprotein A1 and B, glycemia and glycated hemoglobin were also analyzed. The DM2+CAD+ group showed higher averages of plasmatic concentrations of and triglycerides ($P < 0.001$) and lower averages of plasmatic concentrations HDL-C ($P = 0.001$) when compared with control group. The *Xba*I (exon 26) and *Eco*RI (exon 29) polymorphisms of the apo B gene were characterized by PCR-RFLP, and the DNA fragments were identified by electrophoresis in agarose and stained by ethidium bromide after the enzyme restriction. The genotypic frequencies found for the *Xba*I polymorphism were 0.171, 0.458 and 0.371 for the DM2–CAD– group; 0.214, 0.479 and 0.307 for the DM2–CAD+ group; and 0.171, 0.386 and 0.443 for the DM2+CAD+ group, respectively for the X+X+, X+X– and X–X– genotypes. The genotypic frequencies found for the *Eco*RI polymorphism were 0.728, 0.229 and 0.043 for the DM2–CAD– group; 0.657, 0.314 and 0.029 for the DM2–CAD+ group; and 0.700, 0.257 and 0.043 for the DM2+CAD+ group, respectively for the E+E+, E+E– and E–E–. There was no significant difference between the allelic frequencies of the *Xba*I and *Eco*RI polymorphisms of the apo B gene when the 3 groups were compared ($P = 0,8331$ e $P = 0,5828$, respectively, two-tailed Fischer's Exact Test); and neither difference between the genotypic frequencies ($P = 0,9439$ e $P = 0,6701$, respectively, two-tailed Fischer's Exact Test). The frequency of the X–X–/E+E+ genotype of the *Xba*I/*Eco*RI polymorphism of the apo B gene when compared to the other genotypes, showed significant difference ($\chi^2_{(1)} = 6.43$; $P = 0.0112$) between the DM2–CAD+ and DM2+CAD+ groups (more often in the DM2+CAD+ group) validating the use of this genotype as an additional marker of risk for CAD with the presence of DM2 in populational studies.

Key-words: Coronary Artery Disease, CAD, Type 2 *Diabetes mellitus*, apolipoprotein B, apo B, apo B-100, Single Nucleotide Polymorphism, SNP, Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP, *Xba*I, *Eco*RI.

1 INTRODUÇÃO

Variações no gene da apolipoproteína B (apo B) têm sido associadas com a Doença Arterial Coronariana (DAC). A aterosclerose, processo básico da DAC, consiste no espessamento e endurecimento de artérias de médio e grande calibre pela formação da placa aterosclerótica. Manifestações agudas são geralmente causadas por desestabilização da placa aterosclerótica com redução significativa e abrupta da luz do vaso em razão da formação local de trombo, podendo levar à oclusão parcial (angina) ou total (infarto agudo do miocárdio).

As lipoproteínas plasmáticas estão relacionadas com o processo aterosclerótico. A apo B é uma glicoproteína anfipática que desempenha um papel central no metabolismo lipoprotéico humano, em particular no transporte de colesterol no sangue. Concentrações plasmáticas aumentadas de apo B constituem um importante fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças coronarianas (TAHRI-DAIZADEH *et al.*, 2004). Variações no gene da apo B vem sendo estudadas na tentativa de associar esses polimorfismos com a etiologia da DAC ou suas complicações (DELGHANDI *et al.*, 1999; WHITFIELD *et al.*, 2004).

A capacidade de diagnosticar e prevenir prematuramente a DAC continua limitada, apesar dos avanços científicos. O histórico familiar ainda é uma ferramenta adequada e eficaz de triagem para identificar pacientes com predisposição genética. O risco para desenvolvimento de DAC pode ser indicado pela variabilidade do DNA nos genes candidatos, cujos produtos encontram-se envolvidos com o metabolismo lipídico, estrutura e função das apolipoproteínas, aterogênese e trombogênese (LUSIS, 1986; CHAER *et al.*, 2004). O estudo da associação entre doenças e variações polimórficas de genes é empregado para demonstrar o papel de fatores genéticos na etiologia de doenças multifatoriais.

O *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) está associado como um fator de alto risco para a DAC. O fato de que muitos indivíduos com DAC possuem DM2, torna importante a identificação de genes independentes que conferem susceptibilidade para DAC nesses pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Verificar a associação dos polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apolipoproteína B com a DAC e DM2, em uma população brasileira.

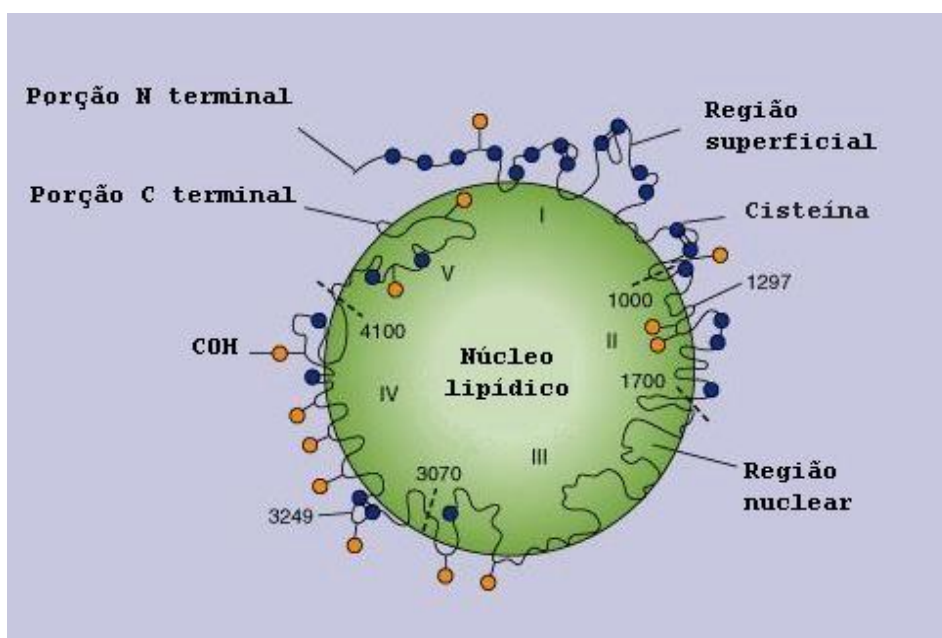
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Associar as variáveis antropométricas e bioquímicas, em indivíduos com DAC na presença ou ausência de DM2, comparando com um grupo controle.
- ❖ Determinar as frequências alélicas, haplotípicas e genótípicas dos polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apolipoproteína B, correlacionando-as com a DAC, na presença ou ausência de DM2.
- ❖ Determinar as frequências do genótipo X-X-/E+E+ do polimorfismo *XbaI/EcoRI* do gene da apolipoproteína B, e compará-lo com os demais genótipos *XbaI/EcoRI*, nos grupos estudados.
- ❖ Verificar a possível associação entre o genótipo X-X-/E+E+ do polimorfismo *XbaI/EcoRI* do gene da apo B e a DAC, na presença ou ausência de DM2.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 APOLIPOPROTEÍNA B E SUAS VARIAÇÕES GENÉTICAS

A apolipoproteína B é uma glicoproteína constituída por 4536 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 540 kDa. A apo B pode ser encontrada em duas formas: apo B-48 e apo B-100. A apo B-100 é a único constituinte protéico da lipoproteína de baixa densidade, a LDL. A natureza anfipática da apo B faz com que as regiões hidrofóbicas estejam imersas no núcleo da LDL e, as hidrofílicas, expostas na superfície da molécula (SEGREST *et al.*, 2001). Esta apolipoproteína possui cinco domínios estruturais, sendo o quarto domínio (aminoácidos 3070-4100) o responsável pela interação da apo B com os receptores da LDL (BROWN e GOLDSTEIN, 1979) e pela manutenção da integridade desta partícula (YANG *et al.*, 1986). Estes processos modulam a remoção de LDL do plasma e regulam a biossíntese do colesterol. A apo B-100 está ilustrada na Figura 1.



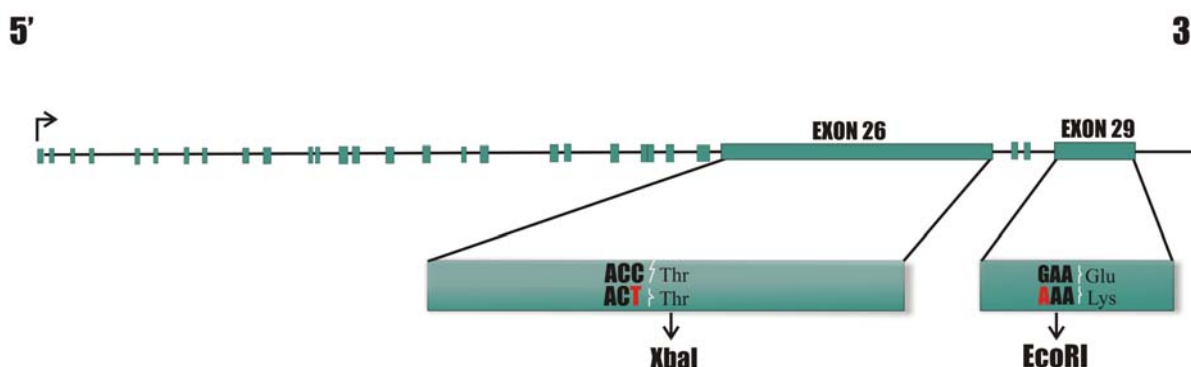
FONTE: Adaptado de SEGREST *et al.*, 2001.

Figura 1 – Representação da apolipoproteína B-100 na lipoproteína de densidade baixa.

O gene da apo B se localiza no braço curto do cromossomo 2 (2p24) e contém 29 exons e 28 introns. A clonagem e o sequenciamento do gene da apo B (KNOTT *et al.*, 1986) tornou possível o estudo de suas variações no DNA humano.

A apo B-48 é codificada pelo mesmo gene que codifica a apo B-100, resultado de um mecanismo de edição do RNA mensageiro. Ocorre a troca da base nucleotídica citosina pela uracila, modificando o códon CAA, que codifica o aminoácido glutamina (posição 2153), para um códon de terminação UAA (CHEN *et al.*, 1987).

Várias mutações polimórficas no gene da apo B já foram estudadas. Dentre os sítios polimórficos já descritos, destacam-se *Xba*I (exon 26), *Eco*RI (exon 29), *Ins/Del* (exon 1 – peptídeo sinalizador), *Msp*I (exon 26) e região hipervariável na extremidade 3' (VNTR). A Figura 2 representa o mapa do gene da apo B, ressaltando os sítios polimórficos relacionados às enzimas *Xba*I e *Eco*RI.



FONTE: Adaptado de CHIODINI *et al.*, 2003.

Figura 2 - Representação esquemática do mapa do gene da apo B. Os 29 exons do gene da apo B estão representados pelas barras verdes sobre a linha superior. No exon 26 está localizado o polimorfismo *Xba*I, e a troca da citosina pela timina não altera o aminoácido codificado (treonina). No exon 29 está localizado o polimorfismo *Eco*RI, e a substituição da guanina pela adenina resulta na troca do ácido glutâmico pela lisina.

3.1.1 Polimorfismo *XbaI* do gene da apolipoproteína B

O polimorfismo *XbaI* do gene da apo B refere-se a uma troca de um nucleotídeo no exon 26, a qual resulta em uma mutação silenciosa, que não afeta a sequência de aminoácidos da apo B. Ocorre a troca de um nucleotídeo citosina por uma timina na terceira posição do códon 2488 (ACC→ACT), que codifica para o mesmo aminoácido treonina. A presença de timina resulta em um sítio de restrição para a enzima *XbaI*, originando o alelo X+, e sua ausência, o alelo X-. Essa variação determina três genótipos X+X+, X+X- e X-X-. O fragmento de 710 pares de bases (pb), gerado pelo método mais amplamente utilizado, que amplifica parte do exon 26, contendo o sítio de mutação, é clivado pela enzima *XbaI* durante a restrição enzimática em dois fragmentos de 433 e 277 pb no alelo X+, e não é clivado no alelo X- (RENGES *et al.*, 1992).

A Tabela 1 resume as frequências dos alelos X+ e X- determinadas em vários estudos, com caucasianos, orientais e africanos.

Vários pesquisadores investigaram associações entre as variações *XbaI* do gene da apo B e a DAC, encontrando resultados discordantes. BOHN e BERG (1994) mostraram que de 12 estudos com polimorfismo do gene da apo B, 5 deles mostraram associação estatisticamente significativa entre o alelo X- e/ou o genótipo X-X- com DAC, quando o grupo DAC+ foi comparado com o respectivo controle.

Na população italiana estudada por BARONI *et al.* (2003), o polimorfismo *XbaI* do gene da apo B foi independentemente associado com DAC. O alelo X+ foi associado com altas concentrações de Colesterol total, LDL-C, Apo B e Triglicérides, e o genótipo X+X+ foi relacionado com o aumento do risco para infarto do miocárdio.

Dois estudos de meta-análises sobre polimorfismos do gene da apo B e DAC ressaltaram as divergências entre os diversos trabalhos existentes (CHIODINI *et al.*, 2003; BOEKHOLDT *et al.*, 2003).

CHIODINI *et al.* (2003) verificaram aumento no risco para DAC em homozigotos X- apenas quando todos os estudos foram analisados em conjunto. BOEKHOLDT *et al.* (2003) concluíram que o genótipo X+X+ estava correlacionado

com concentrações médias de LDL-C e Apo B aumentadas, mas não com aumento de risco para DAC.

Ao comparar brasileiros hipercolesterolêmicos com indivíduos normocolesterolêmicos, CAVALLI *et al.* (2000) não encontraram diferenças significativas nas frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *XbaI* do gene da apo B. SALAZAR *et al.* (2000) encontraram maior frequência do genótipo X-X- em mulheres com DAC quando comparadas com mulheres sem DAC. Os dados de MACHADO *et al.* (2001) não mostraram diferença significativa nas frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *XbaI* de caucasianos brasileiros com problemas cardiovasculares, quando comparados com controles normais. SCARTEZINI *et al.* (2003) também não verificaram diferenças significativas entre as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *XbaI* do gene da apo B ao estudarem brasileiros com e sem DAC.

DUNNING *et al.* (1993) reportaram que a determinação de haplótipos no gene da apo B com múltiplos marcadores possivelmente ajudaria a definir mais especificamente os genótipos associados com DAC.

O sítio de ligação da apo B com o receptor da lipoproteína LDL localiza-se entre os resíduos de aminoácido 3147 e 3381 (KNOTT *et al.*, 1986; YANG *et al.*, 1986). Nesta região gênica estão os sítios polimórficos para as enzimas *XbaI* e *EcoRI*. MYANT *et al.* (1989) sugeriram associação entre DAC e esses marcadores tomados em conjunto em algumas populações, refletindo o desequilíbrio de ligação entre esses sítios e uma mutação na sequência de reconhecimento do receptor, que afetaria o metabolismo da lipoproteína LDL.

SCARTEZINI *et al.* (2003) consideraram o genótipo X-X-/E+E+ como marcador genético de DAC independente de fatores de risco como o Sexo, Idade, Tabagismo, Hipertensão, Colesterol total e Triglicérides. Concluíram que este genótipo pode estar em desequilíbrio de ligação com uma variação desconhecida no gene da apo B ou em outro gene relacionado à DAC.

TABELA 1 – FREQUÊNCIAS DOS ALELOS X+ E X- DO POLIMORFISMO *Xba*I DO GENE DA APO B, EM CAUCASIANOS, ORIENTAIS E AFRICANOS, NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE DAC

| Grupo étnico (País) | Apo B <i>Xba</i> I | | | |
|-------------------------|--------------------|----------------|----------------|---------------------------------------|
| CAUCASIANOS | X + | X – | Grupo | Referência |
| Brasil | 0,386 0,462 | 0,614 0,538 | DAC + DAC – | SCARTEZINI <i>et al.</i> , 2003. |
| Brasil | 0,470 0,380 | 0,530 0,620 | DAC + DAC – | MACHADO <i>et al.</i> , 2001. |
| Brasil | 0,340 0,610 | 0,660 0,390 | DAC + DAC – | SALAZAR <i>et al.</i> , 2000. |
| Brasil | 0,414 0,382 | 0,586 0,618 | DAC + DAC – | DE PÁDUA MANSUR <i>et al.</i> , 2000. |
| Estados Unidos | 0,500 0,529 | 0,500 0,471 | DAC + DAC – | GENEST <i>et al.</i> , 1990. |
| Europa | 0,465 0,454 | 0,535 0,546 | DAC + DAC – | TURNER <i>et al.</i> , 1995. |
| Finlândia | 0,387 0,457 | 0,613 0,543 | DAC + DAC – | NIEMINEN <i>et al.</i> , 1992. |
| França | 0,431 0,470 | 0,569 0,530 | DAC + DAC – | RÉGIS-BAILLY <i>et al.</i> , 1996. |
| Inglaterra | 0,460 0,530 | 0,540 0,470 | DAC + DAC – | MYANT <i>et al.</i> , 1989. |
| Itália | 0,311 0,403 | 0,689 0,597 | DAC + DAC – | CORBO <i>et al.</i> , 1997. |
| ORIENTAIS | | | | |
| China | 0,088 0,025 | 0,912 0,975 | DAC + DAC – | YE <i>et al.</i> , 1995. |
| China | 0,010 0,010 | 0,990 0,990 | DAC + DAC – | PAN <i>et al.</i> , 1995 |
| China | 0,076 0,091 | 0,924 0,909 | DAC + DAC – | SAHA <i>et al.</i> , 1992 |
| Coréia | 0,060 0,050 | 0,940 0,950 | DAC + DAC – | HONG <i>et al.</i> , 2001. |
| Índia | 0,285 0,225 | 0,715 0,775 | DAC + DAC – | PURI <i>et al.</i> , 2003. |
| Índia (descendentes) | 0,200 0,290 | 0,800 0,710 | DAC + DAC – | RENGES <i>et al.</i> , 1991. |
| Japão | 0,020 0,040 | 0,980 0,960 | DAC + DAC – | ABURATANI <i>et al.</i> , 1988. |
| AFRICANOS | | | | |
| Senegal | 0,210 | 0,790 | DAC – | CHAUFFERT <i>et al.</i> , 1997. |
| Etiópia | 0,268 | 0,732 | DAC – | CORBO <i>et al.</i> , 1999. |
| Benin | 0,133 | 0,867 | DAC – | CORBO <i>et al.</i> , 1999. |

3.1.2 Polimorfismo *EcoRI* do gene da apolipoproteína B

O polimorfismo *EcoRI* do gene da apo B refere-se a uma troca da base guanina por adenina (GAA→AAA) no exon 29 (PRIESTLEY *et al.*, 1985), resultando na troca do ácido glutâmico pela lisina. A presença do sítio de clivagem para a *EcoRI* do polimorfismo revela o alelo E+. Quando ocorre a mutação, a enzima *EcoRI* perde o sítio de restrição, originando o alelo E-. Essa variação determina três genótipos: E+E+, E+E- e E-E-. O fragmento de 480 pares de bases (pb), obtido da amplificação parcial do exon 29, é clivado durante a restrição enzimática em dois fragmentos, de 253 e 227 pb no alelo E+, e não é clivado no alelo E-.

A Tabela 2 resume as frequências dos alelos E+ e E- determinadas em vários estudos, com caucasianos, orientais e africanos.

HUMPHRIES (1988) relata que o significado funcional do polimorfismo *EcoRI* ainda é desconhecido. A alta frequência do alelo E- em pacientes com DAC, observando alguns estudos, sugere que a mudança de aminoácido possa alterar o metabolismo de lipoproteínas que contêm apo B, ou resultar em uma apo B mais aterogênica. Alternativamente, é possível que essa variação esteja em desequilíbrio de ligação com outra mutação dentro do gene da apo B ou em genes vizinhos (MYANT *et al.*, 1989; DELGHANDI *et al.*, 1999).

STEPANOV *et al.* (1998) verificaram que indivíduos portadores do alelo raro E- tiveram concentrações de triglicérides superiores às dos homozigotos para E+ (P<0,05). Já DELGHANDI *et al.* (1999) não observaram nenhuma associação significativa entre os alelos e genótipos detectados com *EcoRI* e as concentrações de lípidos e risco para aterosclerose.

MISRA *et al.* (2001) estudaram a população asiática do norte da Índia e não encontraram diferença significativa nas frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *EcoRI* entre os grupos hiperlipêmicos e normolipêmicos.

Os resultados de estudos brasileiros associando o polimorfismo *EcoRI* do gene da apo B com fenótipos clínicos foram relatados por FORTI *et al.* (2003). SALAZAR e colaboradores (2000) não observaram diferenças significativas entre mulheres com e

sem DAC em relação à frequência dos genótipos para o polimorfismo *EcoRI*. Resultados semelhantes foram obtidos por BYDLOWSKI *et al.* (1996) e DE PÁDUA MANSUR *et al.* (2000).

O estudo realizado por SAKUMA *et al.* (2004) relata que o polimorfismo *EcoRI* do gene da apo B está associado com variações no LDL-Colesterol (LDL-C) em Afro-brasileiros.

TABELA 2 – FREQUÊNCIAS DOS ALELOS E+ E E– DO POLIMORFISMO *EcoRI* DO GENE DA APO B, EM CAUCASIANOS, ORIENTAIS E AFRICANOS, NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE DAC

| Grupo étnico (País) | Apo B <i>EcoRI</i> | | | |
|-------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------------------------|
| CAUCASIANOS | E + | E – | Grupo | Referência |
| Brasil | 0,793 0,782 | 0,207 0,218 | DAC + DAC – | SCARTEZINI <i>et al.</i> , 2003. |
| Brasil | 0,806 0,850 | 0,194 0,150 | DAC + DAC – | |
| Brasil | 0,700 0,750 | 0,300 0,250 | DAC + DAC – | SALAZAR <i>et al.</i> , 2000. |
| Estados Unidos | 0,730 0,793 | 0,270 0,207 | DAC + DAC – | GENEST <i>et al.</i> , 1990. |
| Inglaterra | 0,790 0,850 | 0,210 0,150 | DAC + DAC – | MYANT <i>et al.</i> , 1989. |
| Itália | 0,745 0,778 | 0,255 0,222 | DAC + DAC – | CORBO <i>et al.</i> , 1997. |
| ORIENTAIS | | | | |
| China | 0,890 0,960 | 0,110 0,040 | DAC + DAC – | YE <i>et al.</i> , 1995. |
| China | 0,960 0,950 | 0,040 0,050 | DAC + DAC – | |
| China | 0,917 0,929 | 0,083 0,071 | DAC + DAC – | SAHA <i>et al.</i> , 1992. |
| Coréia | 0,950 0,980 | 0,050 0,020 | DAC + DAC – | HONG <i>et al.</i> , 2001. |
| Índia | 0,950 0,820 | 0,050 0,180 | DAC + DAC – | PURI <i>et al.</i> , 2003. |
| Índia (descendentes) | 0,890 0,890 | 0,110 0,110 | DAC + DAC – | RENGES <i>et al.</i> , 1991. |
| AFRICANOS | | | | |
| Senegal | 0,890 | 0,110 | DAC – | CHAUFFERT <i>et al.</i> , 1997. |
| Etiópia | 0,958 | 0,042 | DAC – | CORBO <i>et al.</i> , 1999. |
| Benin | 0,818 | 0,182 | DAC – | CORBO <i>et al.</i> , 1999. |

3.2 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E *DIABETES MELLITUS*

As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte por doença no Brasil (Ministério da Saúde – Brasil, 2005) e em vários países do mundo (WHO – Organização Mundial da Saúde, 2004), e são determinadas por fatores tanto ambientais quanto genéticos (BERNARD *et al.*, 2004), e respondem pela principal causa de morbidade e mortalidade em indivíduos com DM2 (TEMELKOVA-KURKTSCHIEV e HANEFELD, 2004).

Dentre as doenças cardiovasculares, a DAC, representada pelo infarto agudo do miocárdio (IAM) e angina, destaca-se como a maior causadora da incapacidade e morte no nosso meio. É uma doença da idade adulta, de etiologia multifatorial, resultante de uma interação complexa de múltiplos fatores, genéticos e ambientais (VOGEL e MOTULSKY, 1997).

A ocorrência de DAC varia amplamente no mundo e, geralmente, a maior frequência é encontrada em países ocidentais ou com estilo de vida ocidental. Estudos epidemiológicos prospectivos têm demonstrado que a incidência de DAC em indivíduos com *Diabetes mellitus* (DM) é cerca de duas a três vezes maior do que a observada na população em geral (ROSEGREN *et al.*, 1989; STAMLER *et al.*, 1993). A prevalência de DM entre portadores de DAC aumentou significativamente nos últimos 10 anos (TAKAISHI *et al.*, 2004). A ocorrência de eventos coronarianos em pacientes com DM e sem história de doença isquêmica do coração é tão grande quanto em indivíduos sem DM e com histórico de eventos coronarianos. O aumento do risco de eventos cardiovasculares em indivíduos com DM2 pode ser relacionado, ao menos em parte, com anormalidades no metabolismo de lípidos e lipoproteínas (BERNARD *et al.*, 2004).

A aterosclerose coronariana resulta de respostas inflamatórias e fibroproliferativas exacerbadas a vários tipos de injúria ao endotélio e músculo liso da artéria, respostas nas quais participam um grande número de fatores de crescimento, citocinas e moléculas vasoreguladoras (SHIMOKATA *et al.*, 2004). Pacientes com

DM tem risco aumentado de desenvolver complicações específicas, dentre elas, a aterosclerose (American Diabetes Association, 2005), base fisiológica da DAC.

O DM é uma síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. É caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lípidos e proteínas (American Diabetes Association, 2005).

O DM2 está presente em mais de 90% dos indivíduos com DM e anteriormente era descrito como diabetes não-insulino dependente ou diabetes da maturidade. A maioria dos pacientes com este tipo de diabetes apresenta obesidade, a qual é relacionada à resistência à insulina. O risco de desenvolver DM2 aumenta com a idade, obesidade e falta de atividade física. O DM2 está associado com predisposição genética complexa (American Diabetes Association, 2005). A susceptibilidade para DAC em indivíduos com DM não pode ser inteiramente explicada por fatores de risco convencionais; existem fatores genéticos influenciando no desenvolvimento de complicações vasculares nestes indivíduos (LEVY, 2003).

O DM2 tem alta prevalência na população brasileira (7,6%, entre 30 e 50 anos) e é um importante fator de risco independente de DAC (Ministério da Saúde, 2005). Na mulher, é um fator de risco mais expressivo do que no homem, elevando a mortalidade por DAC em 3 a 7 vezes. No indivíduo com DM, é particularmente importante o controle associado dos outros fatores de risco – como sedentarismo, obesidade, tabagismo; para diminuição mais eficaz do risco de DAC (III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose, 2001).

O indivíduo portador de DM2 apresenta em geral um conjunto de anormalidades lipídicas caracterizado por concentrações aumentadas de Triglicérides, redução do HDL-Colesterol (HDL-C) e alteração de LDL-C (KRAUSS, 2004). Este indivíduo deve receber tratamento com critérios de prevenção secundária, recomendado pelas III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose (2001), o qual é mais rígido em relação ao perfil lipídico, especialmente em relação ao LDL-C. Isso reflete a importância dos lípidos no processo da aterosclerose e associação com a DAC.

Evidências de estudos epidemiológicos, correlações clínicas, hiperlipidemias familiares, indicam que os lípides desempenham um papel importante na patogênese da aterosclerose, conseqüentemente da DAC (SANKARANARAYANAN *et al.*, 1999; WHITFIELD *et al.*, 2004).

As dislipidemias apresentam uma função importante no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, base fisiológica da DAC, incluindo infarto agudo do miocárdio. Os lípides plasmáticos e as concentrações de lipoproteínas mostram um padrão de hereditariedade, e mais da metade dos pacientes com DAC prematura apresentam uma alteração genética nas lipoproteínas. Conseqüentemente, os genes envolvidos no metabolismo lipídico, como os que codificam as principais apolipoproteínas, são genes candidatos para DAC (CHIODINI *et al.*, 2003). Portanto, o desenvolvimento da DAC pode ser indicado pela variabilidade do DNA nos genes candidatos, cujos produtos encontram-se envolvidos com o metabolismo lipídico, estrutura e função das apolipoproteínas, aterogênese e trombogênese.

Concentrações plasmáticas elevadas de LDL-C são associados com um aumento no risco de DAC (CASTELLI *et al.*, 1986). A aterogenicidade da partícula de LDL, principalmente a LDL pequena e densa vem sendo reconhecida (BOSSE *et al.*, 2004; CARMENA *et al.*, 2004). Todavia, como a quantidade de colesterol na partícula de LDL pode variar substancialmente, a concentração de LDL-C não é necessariamente igual ao número de partículas de LDL (SNIDERMAN e ROSENBLOOM, 2005). Embora o LDL-C seja o principal alvo terapêutico no tratamento das dislipidemias, sua concentração não reflete o número total de partículas aterogênicas, que incluem também lipoproteínas de intensidade intermediária (IDL) e muito baixa (VLDL). As concentrações de LDL-C podem, inclusive, subestimar o risco para DAC em indivíduos com síndrome metabólica (CARR e BRUNZELL, 2004). A apolipoproteína B é única proteína componente da lipoproteína LDL e suas concentrações plasmáticas são também associadas com doença cardiovascular. As evidências indicam as concentrações plasmáticas de apo B como um indicador de risco de eventos cardiovasculares melhor que as concentrações de LDL-C, por estimar de

maneira mais precisa o número total das partículas aterogênicas, inclusive a LDL pequena e densa (SNIDERMAN *et al.*, 2003; WÄGNER *et al.*, 2003).

Altas concentrações de apolipoproteína B têm sido relacionadas com a ocorrência precoce de DAC, a presença de eventos recorrentes e com processos trombóticos (IZAR *et al.*, 2003). WÄGNER *et al.* (2003) sugerem que a apo B pode identificar fenótipos dislipêmicos de alto risco em pacientes com DM2 normotrigliceridêmicos.

A apo B serve como ligante para o receptor da LDL mediando a remoção plasmática da LDL. Mutações não polimórficas no gene da apo B podem causar Hipercolesterolemia Familiar, caracterizada por aumento das concentrações plasmáticas de LDL-C com deposição de colesterol nos tecidos e aterosclerose prematura (SOUTAR *et al.*, 2003; BENN *et al.*, 2005). Estas variantes genéticas raras não podem explicar toda a variabilidade da apo B na população em geral. Como consequência, estudos encontraram uma grande variedade de polimorfismos no gene da apo apresentando resultados inconsistentes, talvez devido à falta de análises estatísticas adequadas, linhas de seleção e diversidade populacional (IOANNIDIS *et al.*, 2001; WHITFIELD *et al.*, 2004).

A predição de fatores de risco cardiovascular deve ser aprimorada pela combinação de fatores convencionais e outros marcadores de risco, como os polimorfismos genéticos, mesmo porque ainda não está bem claro se fatores genéticos e ambientais influenciando patologias como a DAC são interações sinérgicas ou simplesmente efeitos aditivos aos fatores de risco tradicionais (BERNARD *et al.*, 2004; AUSTIN *et al.*, 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sangue de 210 indivíduos submetidos à angiocoronariografia, classificados nos grupos descritos abaixo, foram utilizadas para a realização desta pesquisa. A seleção dos indivíduos e coleta de sangue foi realizada no serviço de hemodinâmica do Hospital Cardiológico Costantini, uma instituição particular. O Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Protocolo CEP/HC 663.082/2003-05). Para todos pacientes a coleta de sangue foi realizada aproveitando o mesmo vaso utilizado para a angiocoronariografia, no início do procedimento, sendo coletados 5 mL de sangue total em tubos Vacutainer (BD) contendo EDTAK₃ para as extrações de DNA e, 10 mL em tubos Vacutainer com gel separador, para as análises bioquímicas.

Foram considerados indivíduos com DAC (DAC+) aqueles que apresentaram uma redução do diâmetro luminal coronariano maior ou igual a 50% em pelo menos uma artéria coronária, determinado por angiocoronariografia. Pacientes com estenose menor que 50% em todas as artérias coronárias ou que não apresentaram estenose foram considerados não portadores de DAC (DAC-). Estes critérios foram baseados nas Diretrizes de Doença Coronariana Crônica Angina Estável.

Foram considerados indivíduos com *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2+) aqueles com história clínica da doença obtida dos prontuários, valores de glicemia em jejum maiores do que 126 mg/dL ou glicose 2h após sobrecarga de 75g de glicose maiores do que 200 mg/dL, conforme classificação da Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association, 2005).

Foram excluídos do estudo indivíduos com patologias não relacionadas ao DM ou à DAC, como hepatopatias, valvulopatias e doença pulmonar. A frequência de terapia antihipertensiva e antilipemiente foi de 55,7% e 49,5%, respectivamente, entre os indivíduos participantes deste estudo.

A amostra foi dividida em três grupos de acordo com a presença ou não de DM2 e de DAC. A Tabela 3 sumariza a classificação dos grupos estudados.

TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS

| Grupos | Número de Indivíduos | Características |
|-----------------|-----------------------------|---|
| DM2–DAC– | 70 (37 mulheres, 33 homens) | Sem <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 e sem Doença Arterial Coronariana |
| DM2–DAC+ | 70 (18 mulheres, 52 homens) | Sem <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 e com Doença Arterial Coronariana |
| DM2+DAC+ | 70 (27 mulheres, 43 homens) | Com <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 e com Doença Arterial Coronariana |

4.1 VARIÁVEIS ESTUDADAS

4.1.1 Variáveis Antropométricas

As variáveis antropométricas dos pacientes foram obtidas de acordo com Ficha de Coleta de Dados padronizada, cujo modelo encontra-se no Anexo I. As Tabelas 9 e 10 mostram os dados sobre Sexo, Índice de Massa Corporal (IMC), Pressão Arterial Sistólica e Pressão Arterial Diastólica. As medidas de peso e altura foram realizadas em balança antropométrica (Filizola, capacidade para 150 kg e sensibilidade para 100g). O IMC foi calculado através do Índice de Quetelet, dividindo o peso (em quilogramas) pela altura (em metro) elevada ao quadrado. A verificação da pressão arterial foi realizada conforme preconizado pelas IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, através de método indireto (técnica auscultatória), com esfigmomanômetro aneróide (Tykos) e estetoscópio (Littmann), validados e calibrados pelos fabricantes.

4.1.2 Parâmetros Bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram quantificados no soro, obtido por coleta a vácuo em tubo de 10 mL com gel separador (Vacutainer, BD), e os princípios metodológicos e reagentes empregados estão sumarizados na Tabela 4. Os ensaios, calibração e controle de qualidade interno e externo foram realizados conforme

protocolos fornecidos pelo fabricante do reagente. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Frishmann Aisengart de Curitiba.

TABELA 4 – MARCADORES BIOQUÍMICOS

| DOSAGEM | METODOLOGIA | AUTOMAÇÃO / MARCA |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Apolipoproteína AI | Imunoturbidimétrico | Hitachi 912 / Roche |
| Apolipoproteína B | Imunoturbidimétrico | Hitachi 912 / Roche |
| Colesterol total | Enzimático, colorimétrico | Vitros 750 / Johnson & Johnson |
| Glicose | Enzimática, glicose oxidase | Vitros 750 / Johnson & Johnson |
| HDL-Colesterol | Homogêneo, enzimático | Hitachi 912 / Roche |
| Hemoglobina glicada | HPLC com troca iônica | Variant / Bio Rad |
| LDL-Colesterol | Homogêneo, enzimático | Hitachi 912 / Roche |
| Triglicérides | Enzimático, colorimétrico | Vitros 750 / Johnson & Johnson |

Os valores de referência para os parâmetros bioquímicos encontram-se no Anexo IV.

4.2 REAGENTES

A enzima Taq DNA polimerase foi adquirida da MGM Assessoria Biológica S.A. do Brasil, bem como o tampão da Taq DNA polimerase e solução de cloreto de magnésio 50 mM. Os desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) foram adquiridos da Amersham Biosciences. Marcadores de massa molecular de 100 pares de base (100 bp) e 123 pares de base (123 bp) foram adquiridos da Amersham Biosciences e Gibco, respectivamente. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen. A agarose foi adquirida da Invitrogen. A água reagente tipo 1, apresentando condutividade de 18,2 MΩ-cm, foi obtida em sistema Milli-Q (Millipore) e esterilizada por autoclavação. Os demais reagentes utilizados foram provenientes de diversas fontes, e todos eram reagentes de grau analítico.

4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O DNA genômico foi purificado do sangue total pelo procedimento descrito por LAHIRI e NURNBERGER (1991), mas adaptado para tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL. A Figura 3 mostra um esquema das etapas de extração do DNA.

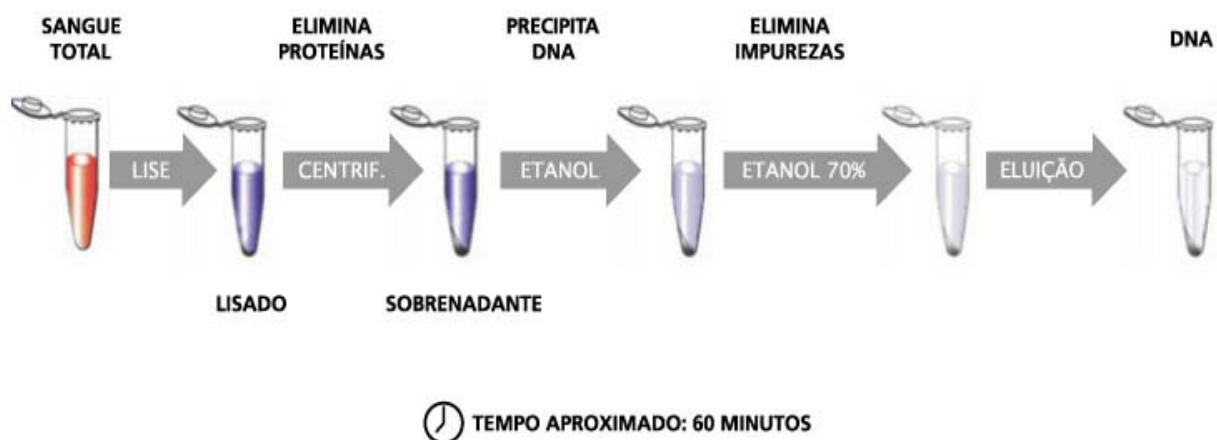


Figura 3 – Processo de extração do DNA de sangue total.

Sinteticamente, o sangue total (1 mL) foi hemolisado com auxílio do detergente Nonidet P-40 (Sigma) em tampão fosfato. As proteínas foram precipitadas em meio contendo alta concentração de cloreto de sódio (concentração final de 3 mol/L) e na presença de 10% de SDS (dodecil sulfato de sódio). O DNA presente no sobrenadante foi, então, precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e as impurezas removidas com duas lavagens com etanol a 70%. O DNA seco a temperatura ambiente foi solubilizado em água tipo MilliQ estéril numa concentração aproximada de 100 ng/ μ L e as amostras mantidas em freezer a -20°C. O tempo aproximado para extração do DNA foi de 60 minutos.

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria em 260 nm e a pureza pela relação da Absorbância 260nm/ Absorbância 280nm ($A_{260/280}$). O procedimento possibilitou a obtenção de amostras com DNA nas concentrações de 50 a 500 ng/ μ L e relação $A_{260/280}$ entre 1,5 e 1,9 (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.4 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS EXONS 26 E 29 DO GENE DA APO B PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Fragmentos de DNA correspondentes às regiões do gene da apo B foram amplificados através da PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR foram aqueles descritos por RENGES *et al.* (1992) e suas seqüências são as seguintes:

- Exon 26 do gene da apo B (polimorfismo *Xba*I):
X 1: F-5'-GGAGACTATTCAGAAGCTAA-3';
X 2: R-5'-GAAGAGCCTGAAGACTGACT-3'.
- Exon 29 do gene da apo B (polimorfismo *Eco*RI):
E 3: F-5'-CTGAGAGAAGTGTCTTCGAAG 3'
E 4: R-5'-CTCGAAAGGAAGTGTAATCAC 3'.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram dissolvidos em água tipo MilliQ estéril na concentração de 100 pmol/μL, e as soluções mantidas em freezer a -20°C. Como solução de uso, uma mistura dos oligonucleotídeos iniciadores 5' e 3' foi preparada a partir da solução estoque, de forma a produzir uma solução contendo 10 pmol/μL de cada iniciador.

As PCRs foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). As condições da reação de PCR para amplificação dos fragmentos dos exons 26 e 29 do gene apo B, foram, respectivamente, as mesmas (com exceção dos oligonucleotídeos iniciadores) e estão descritas nas Tabelas 5 e 6.

A quantidade e qualidade do produto de PCR obtido foram determinadas através da eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, a 60 Volts e 30 miliAmperes durante 1 hora (cuba Horizon 58, Life Technologies) em tampão TBE 1X (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2).

O DNA foi corado com solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens foram obtidas com câmera CCD (sistema Biochemi, UVP).

Inicialmente o procedimento de PCR-RFLP foi realizado como descrito por RENGES *et al.* (1992). O tempo da reação de PCR deste ensaio supera às 4 horas, o que foi considerado excessivamente longo e motivou estabelecer novas condições de reação com tempo reduzido. O ensaio foi então otimizado (Tabelas 5 e 6) com redução de 50% do tempo, e permitiu obter produtos de PCR com boa quantidade e ausência de bandas inespecíficas (Figuras 7 e 8).

As reações de PCR-RFLP com as enzimas *Xba*I e *Eco*RI foram otimizadas nas condições descritas nas Tabelas 7 e 8. Os perfis eletroforéticos dos fragmentos de restrição (Figuras 9 e 10) permitiram a caracterização dos genótipos em estudo sem resultados conflitantes.

TABELA 5 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS EXONS 26 E 29 DO GENE DA APO B HUMANA.

| REAGENTES e DNA | CONCENTRAÇÃO FINAL | VOLUME |
|--|-----------------------------------|--------|
| DNA molde | ~ 10 ng/µL | 1,0 µL |
| Tampão Taq (10X) | 1 X | 1,0 µL |
| MgCl ₂ (50 mM) | 1,5 mmol/L | 0,3 µL |
| dNTP (5 mM) | 0,2 mmol/L | 0,4 µL |
| Oligonucleotídeos Iniciadores (10 pmol/µL, cada) | 20 pmol (cada) [2µmol/L, cada] | 2,0 µL |
| Taq DNA Polimerase (5 U/µL) | 0,2 U/µL | 0,4 µL |
| Água Reagente tipo 1 estéril | ----- | 4,9 µL |
| Volume Final | | 10 µL |

Tampão Taq 10X concentrado: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl

TABELA 6 – PROGRAMA UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS EXONS 26 E 29 DO GENE DA APO B HUMANA.

| Nº CICLOS | ETAPAS | TEMPERATURA (°C) | TEMPO |
|-----------|----------------|------------------|------------|
| 1X | Desnaturação | 94 | 5 minutos |
| 34 X | Desnaturação | 94 | 1 minuto |
| | Anelamento | 58 | 1 minuto |
| | Extensão | 72 | 1 minuto |
| 1 X | Extensão Final | 72 | 10 minutos |

4.5 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO *Xba*I DO EXON 26 DO GENE DA APO B HUMANA.

Para determinação do polimorfismo *Xba*I do exon 26, o produto de amplificação deste exon foi submetido à digestão pela a enzima *Xba*I (Amersham Biosciences), conforme descrito na Tabela 7.

TABELA 7 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DO EXON 26 DO GENE DA APO B COM A ENZIMA *Xba*I

| REAGENTES | Reação | Concentração final |
|---|--------------|--------------------|
| Enzima <i>Xba</i> I (12 U/μL) | 0,6 μL | 0,36 U/μL |
| Albumina Bovina 0,1% | 2,0 μL | 0,01 % |
| Tampão M (10X) | 2,0 μL | 1 X |
| Produto de PCR do exon 26 | 5,0 μL | 5 a 10 ng/μL |
| Água Reagente tipo 1 estéril | 10,4 μL | --- |
| Volume Final | 20 μL | ---- |
| Homogeneizar e deixar em Banho-Maria a 37° C por 4 horas | | |

Tampão M 10X concentrado: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 500 mM NaCl, 10mM DDT, 100mM MgCl₂

4.6 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO *EcoRI* DO EXON 29 DO GENE DA APO B HUMANA.

Para determinação do polimorfismo *EcoRI* do exon 29 do gene apo B, o produto de amplificação deste exon foi submetido à digestão pela a enzima *EcoRI* (Amersham Biosciences), conforme descrito na Tabela 8.

TABELA 8 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DO EXON 29 DO GENE DA APO B COM A ENZIMA *EcoRI*

| REAGENTES | Reação | Concentração final |
|---|-----------------------------|--------------------|
| Enzima <i>EcoRI</i> (15 U/ μ L) | 0,6 μ L | 0,45 U/ μ L |
| Tampão H (10X) | 2,0 μ L | 1 X |
| Produto de PCR do exon 29 | 5,0 μ L | 5 – 10ng/ μ L |
| Água Reagente tipo 1 estéril | 12,4 μ L | --- |
| Volume Final | 20 μL | --- |
| Homogeneizar e deixar em Banho-Maria a 37° C por 4 horas | | |

Tampão H 10X concentrado: 500 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1000 mM NaCl, 10mM DDT, 100mM MgCl₂

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA RESTRIÇÃO COM *XbaI* E *EcoRI*

Ao produto de restrição (10 μ L) foram adicionados 3 μ l de solução de glicerol 30% contendo os corantes azul de bromofenol (0,05%) e xileno cianol (0,05%). A mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,5% como descrito no item 3.4.1. A eletroforese foi interrompida quando o corante azul de bromofenol atingia aproximadamente 2/3 do gel. Os fragmentos de DNA foram corados com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). Os eletroforetogramas foram registrados com o sistema de captação de imagens digitais (câmera CCD) Biochemi (UVP).

Os pontos de corte das enzimas *XbaI* e *EcoRI* nos exons 26 e 29, os possíveis genótipos, bem como os tamanhos dos fragmentos produzidos estão mostrados nas Figuras 4 e 5 .

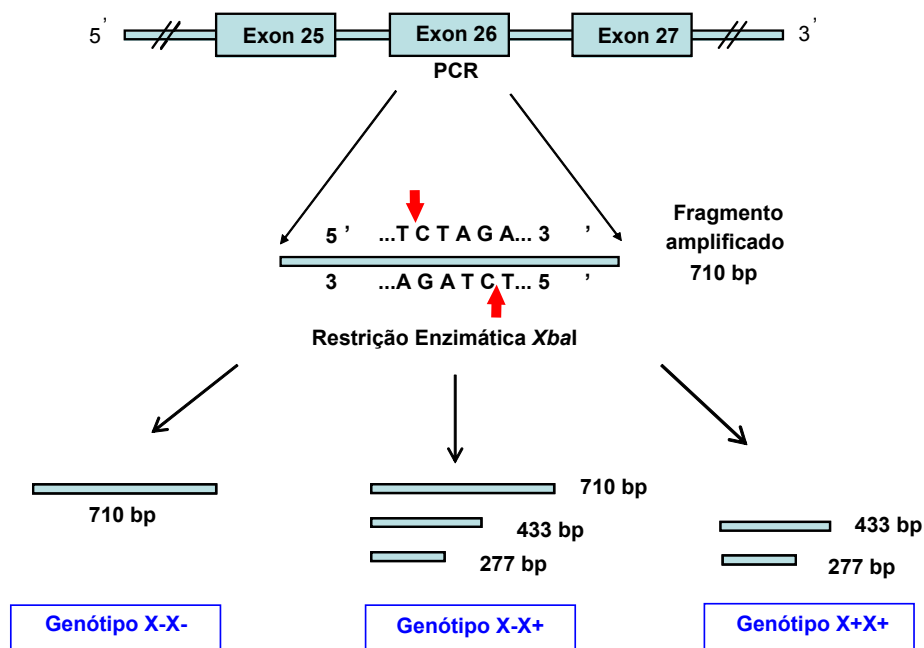


Figura 4 – Representação esquemática do fragmento do exon 26 amplificado e localização do polimorfismo *Xba*I do gene da apo B humana.

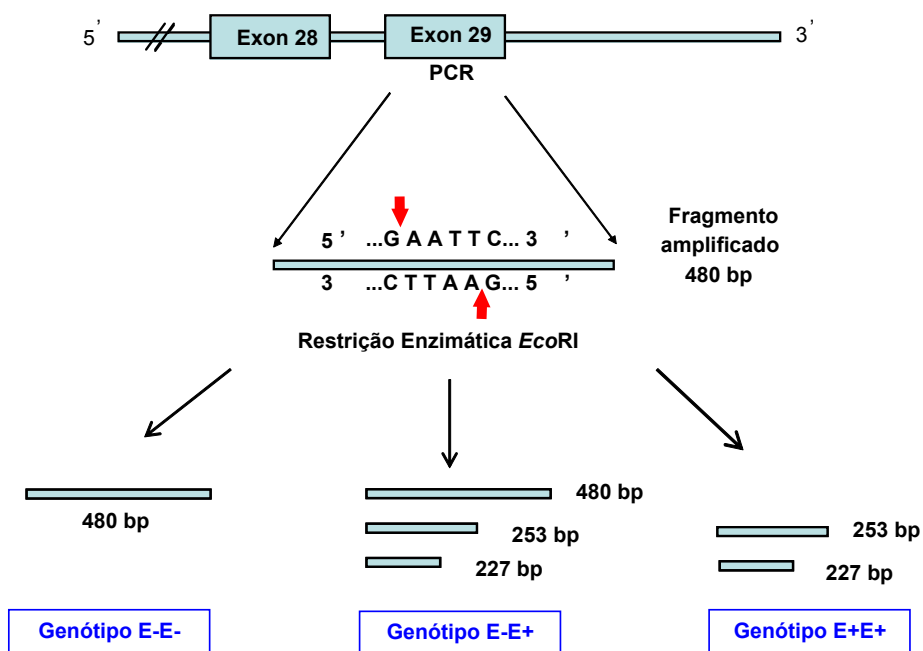


Figura 5 – Representação esquemática do fragmento do exon 29 amplificado e localização do polimorfismo *Eco*RI do gene da apo B humana.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistica para Windows versão 5.0.

As concentrações médias dos marcadores bioquímicos foram comparadas entre os diferentes grupos utilizando-se o teste da análise da variância (ANOVA) ou teste “t” para amostras não pareadas. As frequências alélicas foram obtidas pela contagem dos genes.

O teste de Chi-quadrado (χ^2) foi utilizado para analisar as variáveis categóricas. O grau de liberdade considerado no teste de Chi-quadrado está indicado como índice anexo ao símbolo da estatística, sendo que, $\chi^2_{(1)}$, caracteriza um teste de Chi-quadrado com 1 grau de liberdade. Neste caso, as tabelas de contingência foram analisadas utilizando o programa estatístico RxC (MILLER, 2005). Para a análise de variáveis que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se da transformação logarítmica ou do teste U de Mann-Whitney (não-paramétrico), a fim de normalizá-las.

O Teste Exato de Fisher (bidirecional) foi utilizado para comparar as frequências alélicas e genóticas entre os grupos DM2–DAC–, DM2–DAC+ e DM2+DAC+. E as frequências haplotípicas foram obtidas empregando-se o método da verossimilhança máxima, programa ARLEQUIN – versão 3 (EXCOFFIER e SCHNEIDER, 2005).

Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

A amostra estudada foi composta por 210 indivíduos; sendo 196 euro-brasileiros (93,3%), 10 afro-brasileiros (4,8%) e 4 orientais (1,9%). As distribuições dos indivíduos por sexo e fatores de risco para DAC estão descritas na Tabela 9.

TABELA 9 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS POR SEXO E FATORES DE RISCO PARA DAC NOS GRUPOS ESTUDADOS

| GRUPOS | SEXO | | | | FATORES DE RISCO PARA DAC | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------|------|----------|------|---------------------------|------|-----|------|----------------------|------|-----|------|---------------------------|------|-----|------|
| | Masculino | | Feminino | | Tabagismo | | | | Hipertensão Arterial | | | | Histórico Familiar de DAC | | | |
| | | | | | Sim | | Não | | Sim | | Não | | Sim | | Não | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| DM2–DAC– (N=70) | 33 | 47,1 | 37 | 52,9 | 27 | 38,6 | 43 | 61,4 | 28 | 40,0 | 42 | 60,0 | 29 | 41,4 | 41 | 58,6 |
| DM2–DAC+ (N=70) | 52 | 74,3 | 18 | 25,7 | 42 | 60,0 | 28 | 40,0 | 28 | 40,0 | 42 | 60,0 | 32 | 45,7 | 38 | 54,3 |
| DM2+DAC+ (N=70) | 43 | 61,4 | 27 | 38,6 | 39 | 55,7 | 31 | 44,3 | 37 | 52,9 | 33 | 47,1 | 34 | 48,6 | 36 | 51,4 |
| * P | 0,0416 | | | | 0,0291 | | | | 0,2405 | | | | 0,7126 | | | |

N = número de indivíduos

* Teste do Chi-quadrado, $\chi^2_{(1)}$

Os grupos diferiram significativamente na distribuição entre homens e mulheres ($P=0,0416$), e quanto ao uso de tabaco ($P=0,0291$), sendo que os grupos DAC+ apresentaram maior frequência do sexo masculino e de tabagistas. A presença de hipertensão arterial e o histórico familiar de DAC não foram diferentes entre os 3 grupos estudados.

Os indivíduos estudados apresentaram idade variando entre 36 e 83 anos. A distribuição das frequências de idade nos 3 grupos estudados está representada na Figura 6. A idade média do grupo DM2–DAC– (59 ± 10 anos) foi menor e estatisticamente diferente da média dos grupos DM2–DAC+ (63 ± 11 anos, $P=0,048$) e DM2+DAC+ (65 ± 9 anos, $P=0,002$). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas às médias de idade dos grupos DM2–DAC+ e DM2+DAC+.

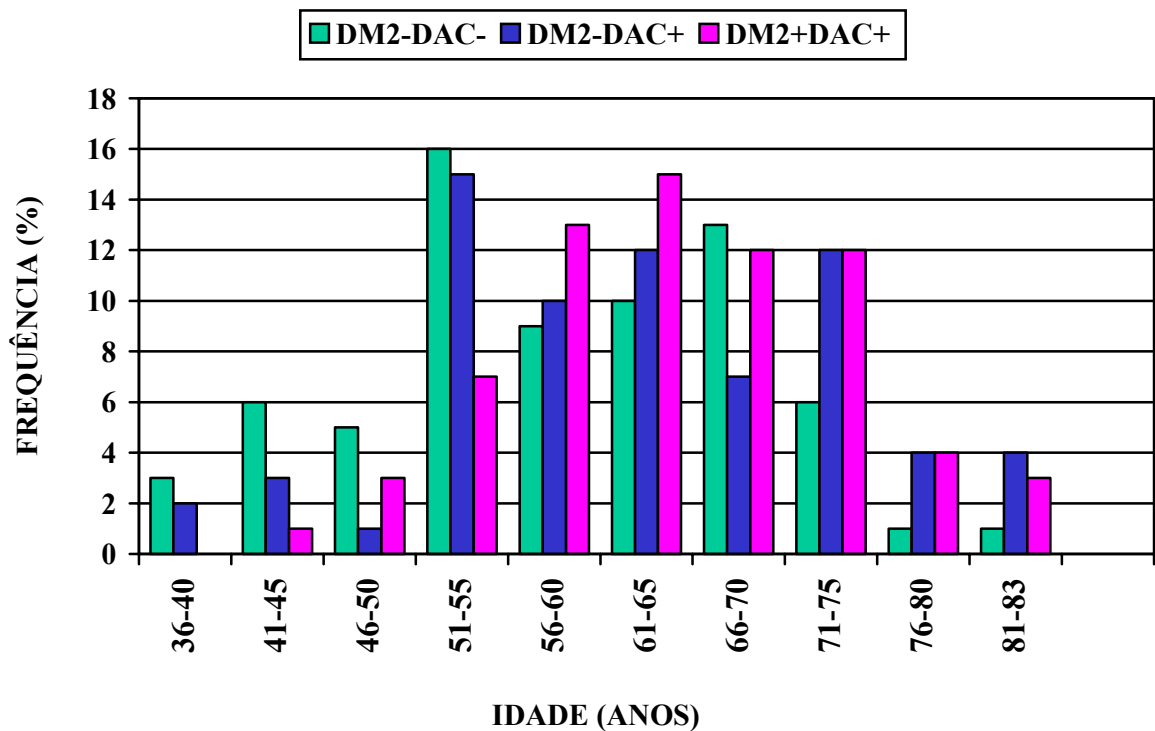


Figura 6 – Distribuição de freqüência de idade

5.1 DADOS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS

A Média (M) \pm Desvio Padrão (DP), a Amplitude de Variação (AV) e valores de P dos dados antropométricos e bioquímicos dos 3 grupos estudados estão mostrados na Tabela 10.

As médias das medidas das pressões arteriais sistólica e diastólica não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos, assim como as concentrações médias das variáveis Colesterol Total, LDL-Colesterol, Apolipoproteína A e Apolipoproteína B.

Os dados apresentados na Tabela 10 mostram que houve diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparadas às médias das variáveis Índice de Massa Corporal, Glicose, Hemoglobina Glicada, HDL-Colesterol e Triglicérides entre os grupos DM2-DAC-, DM2-DAC+ e DM2+DAC+.

TABELA 10 – VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS: DM2–DAC–, DM2–DAC+ E DM2+DAC+, COM MÉDIA (M) \pm DESVIO PADRÃO (DP) E AMPLITUDE DE VARIAÇÃO (AV) DAS VARIÁVEIS ANALISADAS.

| Variáveis | Grupo DM2–DAC– (N=70) | | Grupo DM2–DAC+ (N=70) | | | Grupo DM2+DAC+ (N=70) | | | P*** |
|------------------------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------|-----------------------|-------------|------------------|------------------|
| | M \pm DP | AV | M \pm DP | AV | P* | M \pm DP | AV | P** | |
| IMC (kg/m ²) | 23,9 \pm 3,2 | 16,5 – 33,8 | 26,2 \pm 3,7 | 17,9 – 41,8 | 0,002 | 27,9 \pm 4,7 | 20,1 – 45,8 | <0,001 | 0,022 |
| Pressão arterial sistólica (mmHg) | 141,3 \pm 21,4 | 95 – 220 | 146,0 \pm 19,6 | 110 – 200 | 0,370 | 146,2 \pm 21,4 | 100 – 200 | 0,351 | 0,999 |
| Pressão arterial diastólica (mmHg) | 80,1 \pm 9,2 | 60 – 100 | 78,3 \pm 9,5 | 53 – 100 | 0,447 | 79,9 \pm 8,3 | 59 – 100 | 0,987 | 0,538 |
| Hemoglobina glicada (mg/dL) | 5,3 \pm 0,7 | 2,6 – 6,4 | 5,5 \pm 0,5 | 3,0 – 6,5 | 0,462 | 7,6 \pm 1,6 | 5,1 – 12,4 | <0,001 | <0,001 |
| Glicose (mg/dL) | 90,5 \pm 11,3 | 71 – 116 | 93,9 \pm 12,5 | 54 – 123 | 0,868 | 157,3 \pm 66,4 | 80 – 340 | <0,001 | <0,001 |
| Colesterol Total (mg/dL) | 175,5 \pm 34,8 | 114 – 290 | 167,7 \pm 39,3 | 74 – 295 | 0,446 | 171,6 \pm 39,4 | 94 – 303 | 0,815 | 0,818 |
| HDL-Colesterol (mg/dL) | 47,1 \pm 12,1 | 24 – 78 | 42,9 \pm 11,1 | 24 – 69 | 0,162 | 39,8 \pm 8,9 | 21 – 66 | 0,001 | 0,215 |
| LDL-Colesterol (mg/dL) | 118,9 \pm 28,9 | 52 – 192 | 108,5 \pm 36,2 | 29 – 257 | 0,121 | 112,6 \pm 27,6 | 46 – 174 | 0,463 | 0,714 |
| Triglicérides | 107,7 \pm 58,6 | 31 – 418 | 136,7 \pm 75,8 | 54 – 571 | 0,081 | 166,0 \pm 100,2 | 57 – 588 | <0,001 | 0,076 |
| Apolipoproteína A (mg/dL) | 120,2 \pm 25,7 | 74 – 178 | 114,5 \pm 25,2 | 58 – 184 | 0,369 | 113,3 \pm 24,0 | 61 – 175 | 0,233 | 0,956 |
| Apolipoproteína B (mg/dL) | 88,7 \pm 23,2 | 40 – 163 | 89,5 \pm 27,8 | 19 – 184 | 0,978 | 93,2 \pm 24,2 | 45 – 149 | 0,542 | 0,667 |

N= número de indivíduos

P* = diferença estatística entre Grupo DM2–DAC– e Grupo DM2–DAC+

P** = diferença estatística entre Grupo DM2–DAC– e Grupo DM2 +DAC+

P*** = diferença estatística entre Grupo DM2–DAC+ e Grupo DM2 +DAC+

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi significativamente diferente entre todos os grupos. O grupo DM2+DAC+ apresentou média e amplitude de variação maiores que os outros dois grupos para o IMC.

As concentrações médias de glicose dos indivíduos do grupo DM2+DAC+ foram maiores e diferentes das concentrações médias dos grupos DM2–DAC– e DM2–DAC+, sendo que estes não mostraram diferenças entre si. Esses dados refletem a classificação da amostra, onde os grupos DM2–DAC– e DM2–DAC+ são compostos por indivíduos sem DM2, e o grupo DM2+DAC+ por pacientes com DM2, onde a hiperglicemia é esperada.

As concentrações de Hemoglobina Glicada (HbA_{1c}) apresentaram médias superiores e estatisticamente diferentes somente quando comparado o grupo DM2+DAC+ com os demais grupos sem DM2.

Houve diferença significativa entre os valores médios das concentrações séricas de HDL-C encontrados para o grupo DM2–DAC– e o grupo DM2+DAC+. O grupo DM2+DAC+ apresentou médias inferiores às do grupo controle ($P=0,001$).

As concentrações de Triglicérides no grupo DM2–DAC– foram, em média, menores e significativamente diferentes daquelas encontradas no grupo DM2+DAC+ ($P<0,001$). Os valores de Triglicérides, por não apresentarem distribuição normal, foram normalizados através de transformação logarítmica antes de proceder à análise estatística, porém os resultados não foram diferentes.

5.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE DA APO B

As Figuras 7 a 10 mostram resultados típicos para os produtos de PCR e para os perfis de restrições estudados.

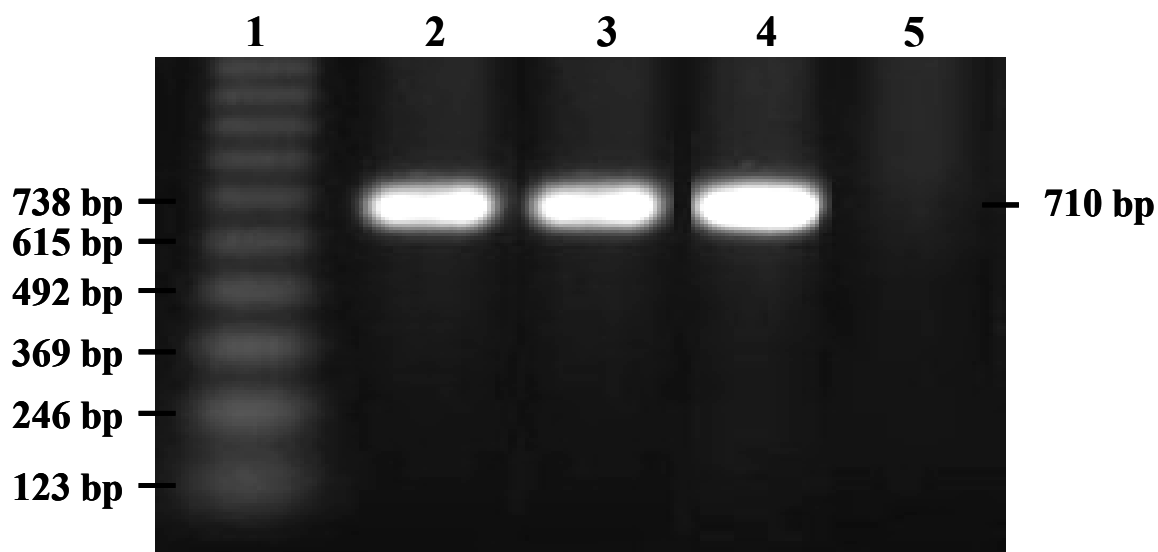


Figura 7 – Perfil eletroforético da PCR para amplificação do polimorfismo *Xba*I do exon 26 do gene da apo B. Eletroforese em agarose 1,5%, em tampão TBE 1X (60V, 30mA). Os produtos de PCR (2 μ L) foram corados com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). As imagens foram registradas com câmera digital CCD Biochemi (UVP). A linha 1 mostra o marcador de massa molecular (123 pb - Gibco); as linhas 2 a 4 mostram produto de PCR da amplificação parcial do exon 26 do gene da apo B (polimorfismo *Xba*I). A linha 5 mostra o controle da reação (sem DNA). O tamanho esperado para o produto de PCR está identificado à direita do gel.

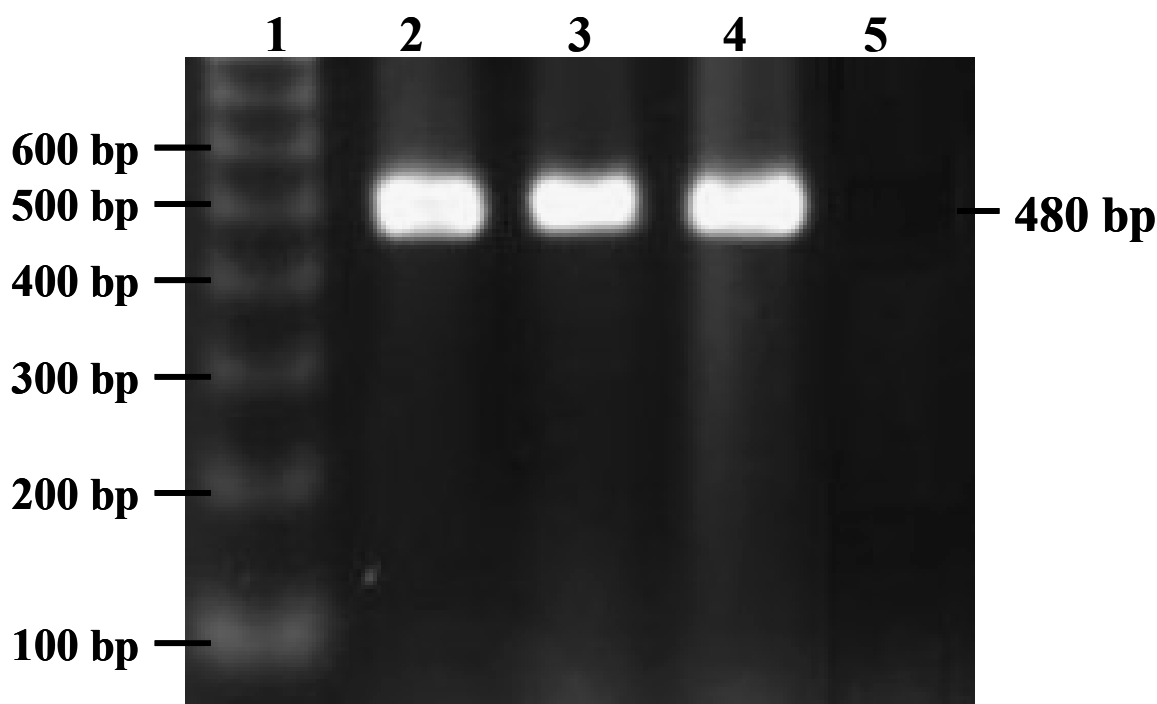


Figura 8 – Perfil eletroforético da PCR para amplificação do polimorfismo *EcoRI* do exon 29 do gene da apo B. Eletroforese em agarose 1,5%, em tampão TBE 1X (60V, 30mA). Os produtos de PCR (2 μ L) foram corados com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). As imagens foram registradas com câmera digital CCD Biochemi (UVP). A linha 1 mostra o marcador de massa molecular (100 pb – Amersham Biosciences); as linhas 2 a 4 mostram produto de PCR da amplificação parcial do exon 29 do gene da apo B (polimorfismo *EcoRI*). A linha 5 mostra o controle da reação (sem DNA). O tamanho esperado para o produto de PCR está identificado à direita do gel.

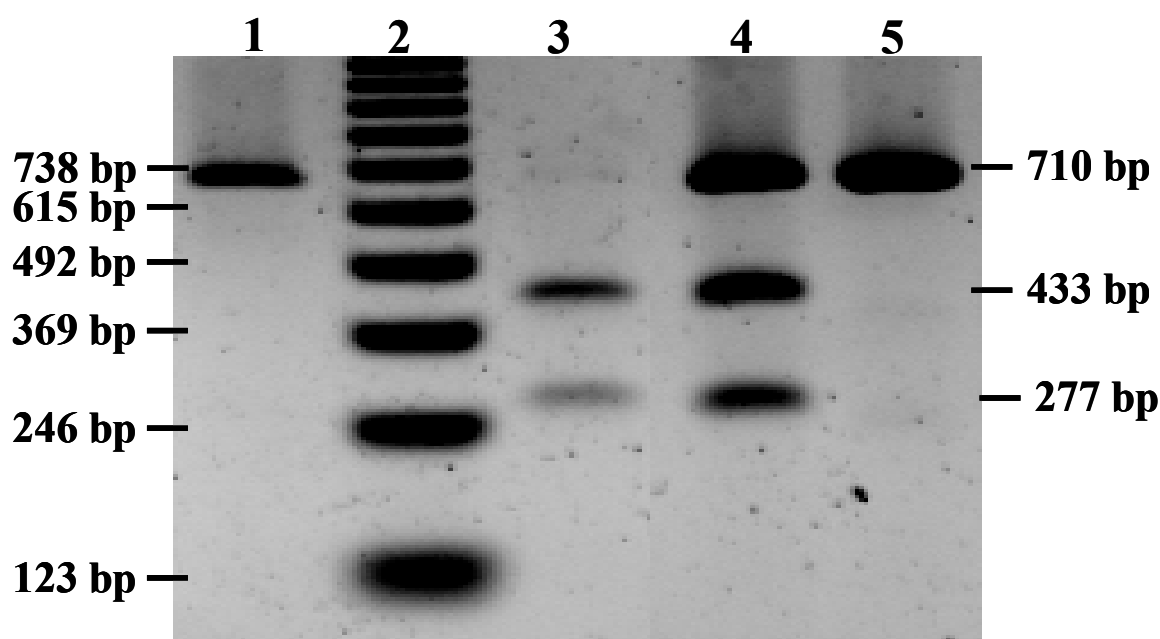


Figura 9 – Perfil eletroforético típico da PCR-RFLP do polimorfismo *Xba*I do exon 26 do gene da apo B. Eletroforese em agarose 1,5%, em tampão TBE 1X (40V, 20mA). Os fragmentos de DNA (10 µL) do polimorfismo *Xba*I do exon 26 do gene da apo B foram corados com brometo de etídeo 0,5µg/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). As imagens foram registradas com câmera digital CCD Biochemi (UVP). A linha 1 mostra o produto de PCR sem corte. A linha 2 mostra o marcador de massa molecular (123 pb – Gibco); as linhas 3 a 5 mostram o perfil de restrição típico para os genótipos X+X+, X+X– e X–X–, respectivamente. Os tamanhos esperados para os fragmentos de restrição e para o produto de PCR sem corte estão identificados à direita do gel.

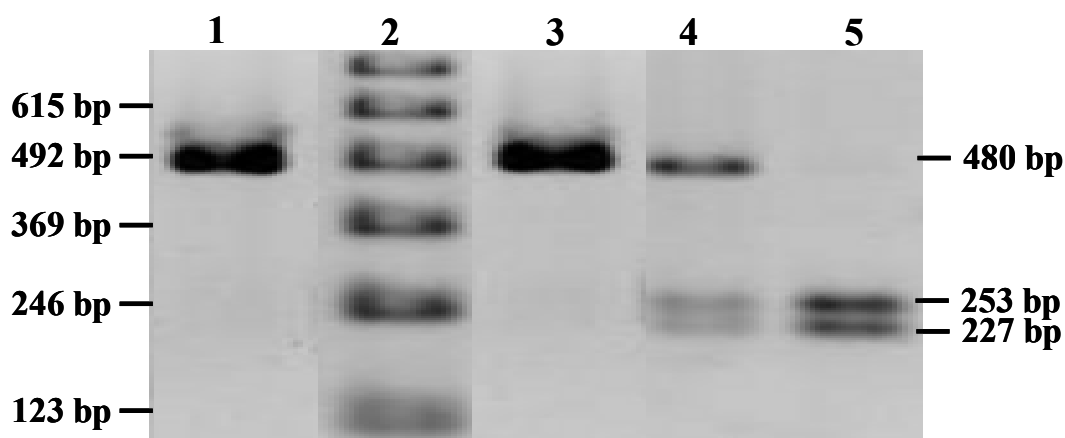


Figura 10 – Perfil eletroforético típico da PCR-RFLP do polimorfismo *Eco*RI do exon 29 do gene da apo B. Eletroforese em agarose 1,5%, em tampão TBE 1X (40V, 20mA). Os fragmentos de DNA (10 μ L) do polimorfismo *Eco*RI do exon 29 do gene da apo B foram corados com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). As imagens foram registradas com câmera digital CCD Biochemi (UVP). A linha 1 mostra o produto de PCR sem corte. A linha 2 mostra o marcador de massa molecular (123 pb – Gibco); as linhas 3 a 5 mostram o perfil de restrição típico para os genótipos E–E–, E+E– e E+E+, respectivamente. Os tamanhos esperados para os fragmentos de restrição e para o produto de PCR sem corte estão identificados à direita do gel.

A variabilidade do gene da apo B *XbaI* e *EcoRI*, das 210 amostras estudadas, está apresentada nas Tabelas 11 a 14, as quais mostram as freqüências dos genótipos e dos alelos, nos grupos DM2–DAC–, DM2–DAC+ e DM2+DAC+.

TABELA 11 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS *XbaI* E *EcoRI* DO GENE DA APO B NOS GRUPOS DM2–DAC– (N=70), DM2–DAC+ (N=70) E DM2+DAC+ (N=70) E NA AMOSTRA TOTAL.

| Genótipos | | | | | | Alelos | | | H-W |
|---------------------|----------|-------------|------------|------------|---------|-------------|------------|--------|-------------------------|
| Apo B | Grupos | X+X+ (N) | X+X– (N) | X–X– (N) | * P | X+ (N) | X– (N) | * P | $\chi^2_{(1)}$; P |
| XbaI exon 26 | DM2–DAC– | 0,171 (12) | 0,458 (32) | 0,371 (26) | P= 0,51 | 0,400 (56) | 0,600 (84) | P=0,28 | $\chi^2=0,158$; P=0,31 |
| | DM2–DAC+ | 0,214 (15) | 0,479 (34) | 0,307 (21) | | 0,457 (64) | 0,543 (76) | | $\chi^2=0,030$; P=0,13 |
| | DM2+DAC+ | 0,171 (12) | 0,386 (27) | 0,443 (31) | | 0,364 (51) | 0,636 (89) | | $\chi^2=0,196$; P=0,34 |
| | Todos | 0,186 (39) | 0,443 (93) | 0,371 (78) | --- | 0,407 | 0,593 | ---- | ---- |
| Apo B | Grupos | E+E+ (N) | E+E– (N) | E–E– (N) | ** P | E+ | E– | * P | $\chi^2_{(1)}$; P |
| EcoRI exon 29 | DM2–DAC– | 0,728 (51) | 0,229 (16) | 0,043 (3) | P= 0,63 | 0,843 (118) | 0,157 (22) | P=0,83 | $\chi^2=1,316$; P=0,75 |
| | DM2–DAC+ | 0,657 (46) | 0,314 (22) | 0,029 (2) | | 0,814 (114) | 0,186 (26) | | $\chi^2=0,107$; P=0,26 |
| | DM2+DAC+ | 0,700 (49) | 0,257 (18) | 0,043 (3) | | 0,829 (116) | 0,171 (24) | | $\chi^2=0,629$; P=0,57 |
| | Todos | 0,695 (146) | 0,267 (56) | 0,038 (8) | ---- | 0,829 | 0,171 | ---- | ---- |

N = número de indivíduos

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

* Valor de probabilidade “P” para o Teste do Chi-quadrado (χ^2); Grau de Liberdade (GL) = 2

** Valor de probabilidade “P” para o Teste Exato de Fisher bidirecional, comparação com DM2–DAC–; Grau de Liberdade (GL) = 1. O teste foi realizado comparando as freqüências E+E+ contra E+E– somado ao E–E–.

Não houve diferença estatisticamente significativa nas freqüências alélicas para os polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apo B entre os 3 grupos estudados (P=0,2858 e P=0,8364, respectivamente). Também não houve diferença estatisticamente significativa nas freqüências genotípicas para os polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apo B entre os 3 grupos estudados (P=0,5079 e P=0,8339, respectivamente), conforme mostrado na Tabela 11.

As distribuições das frequências observadas desses genótipos nos grupos DM2–DAC–, DM2–DAC+ e DM2+DAC+ não mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com aquelas esperadas pela Lei de Hardy-Weinberg, o que sugere que a distribuição genotípica em todos os grupos está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P>0,05$).

As frequências genotípicas e alélicas não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados.

Para comparar os dados deste trabalho com outros estudos, os grupos DM2–DAC+ e DM2+DAC+ foram reunidos formando um grupo designado DAC+. Os dados estão mostrados na Tabela 12. Analisadas as frequências genotípicas e alélicas destes polimorfismos entre os grupos DAC– e DAC+, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

TABELA 12 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS *Xba*I E *Eco*RI DO GENE DA APO B NOS GRUPOS DAC– (N=70) E DAC+ (N=140)

| Genótipos | | | | | | Alelos | |
|--------------------------|--------|------------------------------------|------------|------------|--------|------------------------------------|-------|
| Apo B | Grupos | X+X+ (N) | X+X– (N) | X–X– (N) | *P | X+ | X– |
| <i>Xba</i> I exon 26 | DAC– | 0,171 (12) | 0,458 (32) | 0,371 (26) | P = | 0,400 | 0,600 |
| | DAC+ | 0,193 (27) | 0,432 (61) | 0,375 (52) | 0,9161 | 0,411 | 0,589 |
| | | $\chi^2_{(2)} = 0,11$; P = 0,9439 | | | | $\chi^2_{(1)} = 0,04$; P = 0,8331 | |
| Apo B | Grupos | E+E+ (N) | E+E– (N) | E–E– (N) | * P | E+ | E– |
| <i>Eco</i> RI exon 29 | DAC– | 0,728 (51) | 0,229 (16) | 0,043 (3) | P = | 0,843 | 0,157 |
| | DAC+ | 0,679 (95) | 0,285 (40) | 0,036 (5) | 0,6806 | 0,822 | 0,178 |
| | | $\chi^2_{(2)} = 0,80$; P = 0,6701 | | | | $\chi^2_{(1)} = 0,30$; P = 0,5828 | |

N = número de indivíduos

* Valor de probabilidade “P” para o Teste Exato de Fisher (bidirecional), comparação com DM2–DAC–; Grau de Liberdade (GL) = 1

5.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS E GENÓTIPOS DO GENE DA APO B E DAC NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE DM2

As frequências dos genótipos do polimorfismo *XbaI/EcoRI* do gene da apo B encontradas nos grupos DM2–DAC–, DM2–DAC+ e DM2+DAC+ estão apresentadas na Tabela 13.

TABELA 13 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA (%) DOS GENÓTIPOS *XbaI/EcoRI* DO GENE DA APO B NOS GRUPOS DM2–DAC– (N=70), DM2–DAC+ (N=70) E DM2+DAC+ (N=70).

| GENÓTIPOS | | DM2–DAC– N=70 | | DM2–DAC+ N=70 | | DM2+DAC+ N=70 | |
|-------------|--------------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
| <i>XbaI</i> | <i>EcoRI</i> | N | % | N | % | N | % |
| X+X+ | E+E+ | 11 | 15,71 | 14 | 20,00 | 11 | 15,71 |
| X+X+ | E+E– | 1 | 1,43 | 1 | 1,43 | 1 | 1,43 |
| X+X+ | E–E– | 0 | - | 0 | - | 0 | - |
| X+X– | E+E+ | 26 | 37,14 | 24 | 34,29 | 18 | 25,71 |
| X+X– | E+E– | 6 | 8,57 | 10 | 14,29 | 9 | 12,86 |
| X+X– | E–E– | 0 | - | 0 | - | 0 | - |
| X–X– | E+E+ | 14 | 20,00 | 8 | 11,43 | 20 | 28,57 |
| X–X– | E+E– | 9 | 12,86 | 11 | 15,74 | 8 | 11,43 |
| X–X– | E–E– | 3 | 4,29 | 2 | 2,85 | 3 | 4,29 |

N = número de indivíduos

Teste do Chi-quadrado ($\chi^2_{(12)}=9,45$; P= 0,6641).

Comparando todas as classes genotípicas observadas na Tabela 13, pelo Teste do Chi-quadrado, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos estudados ($\chi^2_{(12)} = 9,45$; P=0,6641).

As frequências haplotípicas do polimorfismo *XbaI/EcoRI* do gene da apo B, mostradas na Tabela 14, foram obtidas com base nos genótipos apresentados na Tabela 13.

TABELA 14 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DOS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DO GENE DA APO B (*XbaI/EcoRI*) NOS GRUPOS DM2–DAC– (N=70), DM2–DAC+ (N=70) E DM2+DAC+ (N=70).

| Apo B <i>XbaI/EcoRI</i> | DM2-DAC- | | DM2-DAC+ | | DM2+DAC+ | | DM2-DAC- x DM2-DAC+ | | DM2-DAC- x DM2+DAC+ | | DM2-DAC+ x DM2+DAC+ | |
|----------------------------|----------|------|----------|------|----------|------|------------------------------------|--------|---------------------------|--------|---------------------------|---------------|
| | N | % | N | % | N | % | $\chi^2_{(1)}$ | P* | $\chi^2_{(1)}$ | P* | $\chi^2_{(1)}$ | P* |
| X+E+ | 55 | 39,3 | 63 | 45 | 49 | 35 | 0,94 | 0,3329 | 0,55 | 0,4580 | 2,92 | 0,0877 |
| X+E- | 1 | 0,7 | 1 | 0,7 | 2 | 1,4 | 0,00 | 1,0000 | 0,00 | 1,0000 | 0,34 | 0,5616 |
| X-E+ | 63 | 45 | 51 | 36,4 | 67 | 47,9 | 2,13 | 0,1444 | 0,23 | 0,6317 | 3,75 | 0,0528 |
| X-E- | 21 | 15 | 25 | 17,9 | 22 | 15,7 | 0,66 | 0,4159 | 0,11 | 0,7378 | 0,23 | 0,6314 |
| Total (N) | 140 | 100 | 140 | 100 | 140 | 100 | $\chi^2_{(2)}=1,47; P^{**}=0,4772$ | | | | | |

N = número de haplótipos

* Valor de probabilidade “P” para o Teste do Chi-quadrado (χ^2); grupos dois a dois; Grau de Liberdade (GL) = 1

** Valor de probabilidade “P” para o do Chi-quadrado (χ^2); entre os 3 grupos; Grau de Liberdade (GL) = 2

Comparando as frequências dos haplótipos do polimorfismo *XbaI/EcoRI* do gene da apo B, pelo Teste do Chi-quadrado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos estudados ($\chi^2_{(2)} = 1,47$; $P=0,4772$).

Ao analisar os grupos DM2–DAC–, DM2–DAC+ e DM2+DAC+, dois a dois, pelo Teste do Qui-quadrado (χ^2), as frequências dos haplótipos do gene da apo B também não foram estatisticamente diferentes. No entanto, o haplótipo X–E+ apresentou diferença próxima da significância ($\chi^2_{(1)} = 3,75$; $P= 0,0528$) entre os grupos DM2–DAC+ e o DM2+DAC+. A partir deste dado, investigou-se a frequência do genótipo X–X–/E+E+ e demais genótipos *XbaI/EcoRI* entre os grupos em estudo, uma vez que o genótipo X–X–/E+E+ foi anteriormente considerado como marcador genético para DAC (SCARTEZINI *et al.*, 2003).

TABELA 15 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (%) DOS GENÓTIPOS X–X–/E+E+ E DEMAIS GENÓTIPOS *XbaI/EcoRI* DO GENE DA APO B NOS GRUPOS DM2–DAC– (N=70), DM2–DAC+ (N=70) E DM2+DAC+ (N=70).

| Apo B <i>XbaI/EcoRI</i> | DM2-DAC- | | DM2-DAC+ | | DM2+DAC+ | | DM2-DAC- x DM2-DAC+ | | DM2-DAC- x DM2+DAC+ | | DM2-DAC+ x DM2+DAC+ | |
|----------------------------|----------|-----|----------|-------|----------|-------|----------------------------------|--------|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
| | N | % | N | % | N | % | χ^2 | P* | χ^2 | P* | χ^2 | P* |
| X-X-/E+E+ | 14 | 20 | 8 | 11,43 | 20 | 28,57 | 1,94 | 0,1635 | 1,40 | 0,2370 | 6,43 | 0,0112 |
| Demais Genótipos | 56 | 80 | 62 | 88,57 | 50 | 71,43 | | | | | | |
| TOTAL | 70 | 100 | 70 | 100 | 70 | 100 | $\chi^2 = 6,29; P^{**} = 0,0430$ | | | | | |

N = número de indivíduos.

* Valor de probabilidade “P” para o Teste do Chi-quadrado (χ^2); grupos dois a dois; Grau de Liberdade (GL) = 1

** Valor de probabilidade “P” para o do Chi-quadrado (χ^2); entre os 3 grupos; Grau de Liberdade (GL) = 2

Comparando as frequências do genótipo X–X–/E+E+ com os demais genótipos *XbaI/EcoRI* do gene da apo B, nos 3 grupos estudados, pelo Teste do Chi-quadrado, a distribuição genotípica foi estatisticamente significativa ($\chi^2_{(2)} = 6,29$; $P=0,0430$). E analisando os grupos estudados, dois a dois, pelo Teste do Chi-quadrado (χ^2), a distribuição do genótipo X–X–/E+E+, comparado com os demais genótipos *XbaI/EcoRI* do gene da apo B, mostrou-se estatisticamente diferente entre os grupos DM2–DAC+ e o DM2+DAC+ ($\chi^2_{(1)} = 6,43$; $P = 0,0112$), conforme Tabela 15.

6 DISCUSSÃO

As alterações na sequência do DNA contribuem para variações fenotípicas, influenciando características individuais antropométricas, risco de doenças e resposta ao ambiente.

Os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) são variações no genoma que surgem a partir de mutações de ponto. Análises do sequenciamento do genoma humano estimam em 1,42 milhões a presença de SNPs, na proporção de cerca de um SNP para cada 1,9 kilobases (The International SNP Map Working Group, 2001).

A procura de genes relacionados à susceptibilidade para a doença cardiovascular e o DM2, tem sido objeto de intensa pesquisa, face ao grande impacto destas patologias nas sociedades modernas (FRANCKE *et al.*, 2001).

As diferentes características relacionadas à etnia, associadas intrinsecamente aos estudos de polimorfismos, aumentam a relevância da pesquisa da variabilidade na miscigenada população brasileira, na busca de associações ou identificação de particularidades na comparação com outros estudos populacionais.

Como elemento essencial ao complexo mecanismo de transporte e metabolismo do Colesterol sérico, a apo B, tem sido alvo de intensa pesquisa com ênfase na identificação de patologias de origem genética ou na busca de marcadores de risco associados à DAC.

Neste estudo, os polimorfismos de único nucleotídeo no gene da apoB, detectados com as enzimas de restrição *XbaI* e *EcoRI*, são pesquisados em uma população caracterizada quanto à presença de DAC por angiocoronariografia e separada em grupos quanto à presença ou não de DM2.

6.1 VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS

As características sócio-econômicas dos indivíduos estudados (N=210), como a disponibilidade de planos de saúde permitindo acesso ao serviço privado de hemodinâmica, e as características da colonização da região geográfica em que foi

realizado o estudo – região Sul do país, podem responder pela predominância de euro-brasileiros na amostra (93,3%).

Entre os fatores de risco para Doença Arterial Coronariana analisados (Tabela 9), as frequências de hipertensão arterial ($P=0,2405$) e história familiar para DAC ($P=0,7126$) não diferiram entre os grupos estudados. Este achado reflete as características dos pacientes que são submetidos ao processo invasivo de cineangiocoronariografia, e nossos dados não diferem do esperado (III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose, 2001).

A presença de tabagismo foi significativamente menor ($P=0,0291$) no grupo controle DM2–DAC– em relação aos demais grupos. A maior prevalência desse fator de risco modificável em grupos onde a DAC está presente pode sugerir o envolvimento desse elemento na gênese da alteração vascular. A associação entre o tabagismo e DAC está bem estabelecida e demonstrada em inúmeros trabalhos (BAKHURU e ERLINGER, 2005; SHARMA *et al.*, 2005). Face à elevada frequência de tabagistas com DAC e, associando às condições sócio-culturais muito favoráveis da população estudada, é possível sugerir que as campanhas anti-tabaco não estão atingindo com eficácia este público alvo.

A frequência significativa de homens com DAC em relação às mulheres era esperada e reflete a já descrita prevalência desta patologia no sexo masculino (III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose, 2001; RABELO *et al.*, 2003a).

A comparação das médias da variável Idade mostra que o grupo controle DM2–DAC– é formado por indivíduos com 4 e 6 anos a menos que aqueles dos grupos DM2–DAC+ e DM2+DAC+, respectivamente.

Os valores médios de Índice de Massa Corporal (IMC, Tabela 10) foram significativamente maiores ($P=0,002$) quando os grupos com DAC foram comparados ao controle (Média: 26,2 e 27,9 versus 23,9 kg/m²). Medidas de IMC ≥ 25 kg/m² são correlacionados ao aumento de risco para DAC (FRUCHART *et al.*, 2004). As médias para IMC > 25 kg/m² observadas para os grupos com DAC+ neste estudo, estão em

concordância com os trabalhos que relacionam o sobrepeso e a obesidade com as doenças cardiovasculares (HAWKINS, 2004).

Os valores médios das pressões arteriais sistólica e diastólica não foram diferentes entre todos os grupos em estudo. O uso agressivo da terapia antihipertensiva é característica comum dos pacientes que freqüentam os serviços de cardiologia, e poderia explicar este achado. Mesmo assim, os valores médios superiores a 141 mmHg observados para a pressão sistólica em todos os grupos estão acima dos valores preconizados como normais (<130 mmHg) pelas IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial.

As concentrações de glicemia em jejum e hemoglobina glicada foram significativamente diferentes ($P<0,001$) entre o grupo DM2+DAC+ com relação aos demais.

A hemoglobina glicada A_{1C} é um marcador do controle glicêmico nas 6 semanas anteriores à sua dosagem, permitindo monitorar a adesão do paciente ao tratamento. As concentrações médias de HbA_{1C} foram superiores no grupo DM2+DAC+ e sugerem um controle inadequado para glicemia (American College of Endocrinology, 2002; SACKS *et al.*, 2002). Concentrações elevadas da glicose plasmática, mantidos por longos períodos são responsáveis pelo aumento na glicação de proteínas resultando em incremento dos eventos coronarianos e trombóticos (COOPER, 2004).

Entre os componentes do perfil lipídico, Colesterol total, LDL-C, HDL-C e Triglicérides, apenas os dois últimos apresentaram concentrações séricas significativamente diferentes ($P<0,001$) entre o grupo controle e o grupo DM2+DAC+. As concentrações médias elevadas de Triglicérides de 166 mg/dL (desejável <150 mg/dL) observadas no grupo com DM2 são esperados, uma vez que as alterações metabólicas associadas à esta patologia favorecem a hipertrigliceridemia. Da mesma forma, a observada redução nas concentrações médias de HDL-C de 39,8 mg/dL (desejável > 45 mg/dL) no grupo DM2+ pode ser um reflexo das concentrações elevadas de Triglicérides que estão associados à redução do HDL-C decorrente da

redução do catabolismo das lipoproteínas ricas em Triglicérides, já associadas ao DM2 (RABELO *et al.*, 2003).

As concentrações séricas das apolipoproteínas AI e B não foram diferentes entre os grupos em estudo.

Concentrações elevadas de Colesterol total, LDL-C e Apolipoproteína B estão associados à DAC (HOMMA, 2004; TAKAISHI *et al.*, 2004). Os valores médios observados em todos os grupos estão próximos aos valores de referência para estes analitos. O uso de medicamentos hipolipemiantes, amplamente utilizados na cardiologia clínica, e, conseqüentemente, nos pacientes em estudo, pode justificar os valores para o perfil lipídico próximos aos valores desejáveis.

6.2 VARIABILIDADE GENÉTICA

As frequências genóticas para os polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apo B não foram diferentes entre os grupos em estudo (Tabela 11). Em todos os grupos as distribuições genóticas foram similares ($P>0,05$) àquelas esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

É pertinente ressaltar que a presença do DM2 nos grupos com DAC não causou diferenças significativas nas frequências alélicas ou genóticas dos polimorfismos *XbaI* e *EcoRI*. Este achado é relevante, uma vez que o desenho experimental de vários estudos similares a este publicados com dados da população brasileira não discrimina os indivíduos com DM2. Este é o primeiro estudo que associa os polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apo B com o DAC na presença ou ausência de DM2, em uma população brasileira.

Para efeitos de comparação com outros dados obtidos da literatura os grupos DM2–DAC+ e DM2+DAC+ foram unidos em um grupo designado DAC+ (Tabela 12), representando o desenho experimental comumente utilizado em vários estudos.

As frequências dos alelos dos polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apo B, em indivíduos com e sem DAC, diferem em populações caucasianas e orientais (MYANT *et al.*, 1989; RENGES *et al.*, 1991; RENGES *et al.*, 1992). A comparação

entre as frequências alélicas, dos polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apo B deste estudo com as frequências de coreanos, obtidas por HONG *et al.* (2001), mostrou diferença significativa tanto para o grupo DAC+ (*XbaI* : $\chi^2_{(1)} = 142,67$; $P < 0,0001$ e *EcoRI* : $\chi^2_{(1)} = 8,30$; $P < 0,0001$), como para o grupo DAC- (*XbaI* : $\chi^2_{(1)} = 112,07$; $P < 0,0001$ e *EcoRI* : $\chi^2_{(1)} = 22,51$; $P < 0,0001$). Diferenças significativas também foram verificadas ao comparar as frequências alélicas *XbaI* e *EcoRI* dos grupos DAC+ em indianos obtidas por PURI *et al.* (2003) com as deste trabalho (*XbaI* : $\chi^2_{(1)} = 5,36$; $P = 0,0206$ e *EcoRI* : $\chi^2_{(1)} = 9,84$; $P = 0,0017$). Entre os grupos DAC-, as frequências dos alelos X+ e X- encontradas por esses dois grupos de pesquisadores apresentaram diferença ($\chi^2_{(1)} = 8,62$; $P = 0,0033$); e as frequências dos alelos E+ e E- não mostraram diferença significativa (*EcoRI* : $\chi^2_{(1)} = 0,22$; $P = 0,6395$).

Em relação aos alelos do polimorfismo *XbaI* (Tabela 1), a frequência do alelo comum X- em caucasianos varia de 0,390 a 0,62 na ausência de DAC, e, de 0,50 a 0,69, em indivíduos com DAC. As frequências do alelo X- obtidas neste trabalho (DAC- = 0,60; DAC+ = 0,59) estão dentro desta faixa de variação.

As frequências dos alelos X+ e X- dos grupos DAC+, não foram significativamente diferentes ($\chi^2_{(1)} = 0,39$; $P = 0,5331$) daquelas encontradas por SCARTEZINI *et al.* (2003) para euro-brasileiros; assim como as frequências dos alelos X+ e X- dos grupos DAC- também não apresentaram diferenças significativas ($\chi^2_{(1)} = 1,14$; $P = 0,2860$).

Comparando as frequências alélicas de X+ e X- do grupo DAC+ encontradas neste estudo, com os dados de MACHADO *et al.* (2001), não houve diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 1,31$; $P = 0,2531$). O mesmo aconteceu quando as frequências encontradas nos controles (N=67) foram comparadas com aquelas do grupo controle deste trabalho ($\chi^2_{(1)} = 0,14$; $P = 0,7055$).

Ao comparar nossos dados com os dados encontrados por SALAZAR *et al.* (2000) para o polimorfismo *XbaI*, os grupos com DAC não mostraram diferenças significativas ($\chi^2_{(1)} = 1,55$; $P = 0,2138$). No entanto, os grupos DAC- (controle), foram diferentes estatisticamente ($\chi^2_{(1)} = 14,56$; $P = 0,0001$). Esta diferença pode estar

relacionada ao fato de que a amostra de SALAZAR *et al.* (2000) ser composta apenas por mulheres hospitalizadas.

As freqüências dos alelos X+ e X- obtidas por CAVALLI *et al.* (2000), quando comparadas àquelas encontradas neste estudo, não mostraram diferenças significativas entre o grupo com hipercolesterolemia e o grupo DAC+ ($\chi^2_{(1)} = 0,38$; $P=0,5385$), e nem entre o grupo de normocolesterolêmicos e o grupo DAC- ($\chi^2_{(1)} = 0,01$; $P=0,9263$).

A freqüência alélica do polimorfismo *XbaI* do gene da apo B dos grupos controle deste estudo e aquela descrita por CHIODINI *et al.* (2003) foi diferente ($\chi^2_{(1)} = 37,25$, $P<0,0001$).

Comparando as freqüências dos alelos X+ e X- do grupo DAC- deste estudo, com as do grupo DAC- descritas por BOEKHOLDT *et al.* (2003), foram observadas diferenças significativas ($\chi^2_{(1)} = 4,84$; $P=0,0278$). Esses pesquisadores associaram o alelo raro X+ com aumento nas concentrações de LDL-Colesterol e Apolipoproteína B, mas também com uma redução no risco para desenvolvimento de doenças isquêmicas do coração. Sugeririam, então, que alterações no gene da apo B possam modificar as propriedades aterogênicas da LDL sem influenciar os fatores de risco adicionais, ou seja, mudanças estruturais da apo B causariam hipercolesterolemia e uma LDL modificada, menos aterogênica. TAHRI-DAIZADEH *et al.* (2004) sugerem que o polimorfismo *XbaI* do gene da apo B não tenha efeito isolado, mas, pelo fato de promover uma mutação silenciosa, pode estar em forte desequilíbrio de ligação com algum variante biologicamente funcional.

Em relação aos alelos do polimorfismo *EcoRI*, a literatura mostra que a freqüência do alelo raro E- em caucasianos varia de 0,15 a 0,25 em controles, e, de 0,19 a 0,30, em indivíduos com DAC (Tabela 2). As freqüências do alelo E- obtidas neste trabalho (DAC- = 0,16; DAC+ = 0,19) estão dentro desta faixa de variação.

As freqüências dos alelos E+ e E- dos grupos DAC+ deste estudo (Tabela 12), foram similares ($\chi^2_{(1)} = 0,66$; $P=0,4174$) daquelas encontradas por SCARTEZINI *et al.* (2003), assim como as freqüências dos grupos DAC- ($\chi^2_{(1)} = 1,78$; $P=0,1824$).

Comparando as frequências alélicas de E+ e E- do grupo DAC+, com os dados de MACHADO *et al.* (2001), não foi encontrada diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 0,14$; $P=0,7039$). O mesmo aconteceu quando as frequências encontradas em seus controles foram comparadas com aquelas encontradas no grupo controle deste trabalho ($\chi^2_{(1)} = 0,03$; $P=0,8562$). Quando nossos dados foram comparados com os dados obtidos por SALAZAR *et al.* (2000), foram observadas diferenças tanto em relação aos grupos DAC- ($\chi^2_{(1)} = 9,18$; $P=0,0024$), como em relação aos grupos DAC+ ($\chi^2_{(1)} = 6,54$; $P=0,0106$). Esta diferença pode estar relacionada ao fato de que a amostra de SALAZAR *et al.* (2000) ser composta apenas por mulheres hospitalizadas.

Comparando o grupo DAC- deste estudo com o grupo DAC- descrito por BOEKHOLDT *et al.* (2003) em sua metanálise com caucasianos, não foi encontrada diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 1,42$; $P=0,2333$) em relação às frequências dos alelos E+ e E-. O mesmo ocorreu ao se comparar o grupo DAC- descrito por CHIODINI *et al.* (2003) em sua metanálise com caucasianos, com o grupo DAC- deste estudo ($\chi^2_{(1)} = 0,04$; $P=0,8514$).

A Tabela 13 foi elaborada para observar a distribuição de frequência dos genótipos *XbaI/EcoRI* do gene da apo B. A análise dos dados permitiu o estudo de haplótipos com o programa ARLEQUIN.

A frequência do haplótipo X-E+ em indivíduos caucasianos na ausência de DAC varia de 0,34 a 0,47 (MONSALVE *et al.*, 1988; HANSEN *et al.*, 1993; BENEDICTIS *et al.*, 1997). A frequência encontrada neste estudo, para o grupo controle, está dentro destes limites (DAC- = 0,45).

As frequências dos haplótipos *XbaI/EcoRI* (Tabela 14) obtidas no presente estudo não apresentaram diferença significativa entre os grupos DAC+ e DAC- ($P=0,4820$). Deve-se ressaltar que o haplótipo X-E+ mostrou diferença entre os grupos DM2-DAC+ e DM2+DAC+ próxima da significância ($\chi^2_{(1)} = 3,75$; $P=0,0528$).

A frequência do haplótipo X-E+ do polimorfismo *XbaI/EcoRI* do gene da apo B encontrada por SCARTEZINI *et al.* (2003) não difere da frequência encontrada neste estudo ($\chi^2_{(1)} = 0,01$; $P=0,9096$).

A comparação entre o genótipo X–X–/E+E+ (Tabela 15), com os demais genótipos *XbaI/EcoRI* do gene da apo B apresentou diferença significativa entre os grupos DM2–DAC+ e DM2+DAC+ ($\chi^2_{(1)} = 6,43$; $P = 0,0112$).

SCARTEZINI *et al.* (2003) encontraram diferenças significativas ($\chi^2_{(1)} = 6,27$; $P = 0,012$) entre as frequências do genótipo X–X–/E+E+ e os demais genótipos *XbaI/EcoRI* do gene da apo B para os grupos DAC+ e DAC–. Com base neste achado, estes pesquisadores sugerem o uso do genótipo X–X–/E+E+ do polimorfismo *XbaI/EcoRI* gene da apo B como possível marcador de risco para DAC.

A presença ou ausência de DM2 na amostra de SCARTEZINI *et al.* (2003) não foi critério para a classificação dos seus grupos. Os grupos DAC+ e DAC– caracterizados por estes autores continham pacientes com DM2 na proporção de 16% e 8%, respectivamente.

Comparando a frequência do genótipo X–X–/E+E+ do presente estudo com aquela descrita por SCARTEZINI *et al.* (2003), não foi verificada diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 1,55$; $P = 0,2130$).

Nossos dados sugerem que a presença do *Diabetes mellitus* tipo 2 associado à Doença Arterial Coronariana pode ser o determinante responsável pela diferença significativa na frequência genotípica entre os grupos DM2–DAC+ e DM2+DAC+. O DM2 e a DAC são condições associadas à herança multifatorial, onde a combinação de um ou múltiplos genes e o meio ambiente contribuem para o desenvolvimento de uma patologia. Nestes casos, o risco de desenvolver a patologia pode depender do sexo, da etnia, do histórico familiar, número de parentes afetados e grau de parentesco (McCARTHY, 2004; NORDLIE *et al.*, 2005; AGARWAL e MOORCHUNG, 2005). Portanto, a presença do DM2 pode ser um fator diferencial na caracterização genotípica dos polimorfismos estudados neste trabalho.

Futuros estudos que permitam diferenciar características peculiares nos indivíduos com DM2 podem ressaltar a associação entre a variabilidade do gene da apo B e a Doença Arterial Coronariana.

Em síntese, os dados obtidos das frequências genótípicas dos polimorfismos *Xba*I e *Eco*RI do gene da apo B não foram diferentes entre os grupos DM2–DAC+ (controle), DM2–DAC+ e DM2+DAC+; e a frequência do genótipo X–X–/E+E+ foi diferente entre os grupos DM2+DAC+ e DM2–DAC+, permitindo sugerir que este genótipo pode ser utilizado como marcador adicional de risco em estudos populacionais.

7 CONCLUSÕES

- ❖ Verificou-se maior prevalência do sexo masculino e de Tabagismo, assim como média superior das variáveis Idade e IMC, nos grupos de indivíduos com DAC (DM2–DAC+ e DM2+DAC+).
- ❖ O grupo DM2+DAC+ apresentou concentrações séricas de triglicérides com médias superiores às do grupo controle ($P < 0,001$), e concentrações séricas de HDL-C com médias inferiores às do grupo controle ($P = 0,001$).
- ❖ Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos *XbaI* e *EcoRI* do gene da apo B quando comparados os 3 grupos em estudo (DM2–DAC–, DM2–DAC+ e DM2+DAC+).
- ❖ O genótipo X–X–/E+E+ do polimorfismo *XbaI/EcoRI* do gene da apo B comparado aos demais genótipos, mostrou diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 6,43$; $P = 0,0112$) entre os grupos DM2–DAC+ e DM2+DAC+.
- ❖ O genótipo X–X–/E+E+ do polimorfismo *XbaI/EcoRI* do gene da apo B pode ser utilizado como marcador adicional de risco para DAC em indivíduos portadores de *Diabetes mellitus* tipo 2.

REFERÊNCIAS

III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.77, suplemento III, 2001. p. 5-7;13-19;26-27;32-35;42.

IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.9, p.359-408, 2002.

ABURATANI, H.; MATSUMOTO, A.; ITOH, H.; YAMADA, N.; MURASE, T.; TAKAKU, F.; ITAKURA, H. A study of DNA polymorphism in the apolipoprotein B gene in a Japanese population. **Atherosclerosis**, v.72, p. 71-76, 1988.

AGARWAL, S.; MOORCHUNG, N. Modifier genes and oligogenic disease. **J. Nippon Med. Sch.**, v.72, p.326-334, 2005.

American College of Endocrinology Consensus Statement on Guidelines for Glycemic Control. **Endocr Pract**, v.8, S1, 2002.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of *Diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v.28, supl.1, p. S37-S42, 2005.

AUSTIN, M. A.; HUTTER, C.M.; ZIMMERN, R.L.; HUMPHRIES, S.E. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. **Am. J. Epidemiol.**, v.160, p. 421-429, 2004.

BARONI, M.; BERNI, A.; ROEMO, S.; ARCA, M.; TESORIO, T.; SORROPAGO, G.; DI MARIO, U.; GALTON, D.J. Genetic study of common variants at the apo E, apo AI, apo CII, apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. **BMC Med. Genet.**, v.4, 8 p., 2003.

BAKHURU, A.; ERLINGER, T.P. Smoking cessation and cardiovascular disease risk factors: results from the third national health and nutrition examination survey. **PloS Med.**, v.2, p. 528-536, 2005.

BENEDICTIS, G.; FALCONE, E.; ROSE, G.; RUFFOLO, R.; SPADAFORA, P.; BAGGIO, G.; BERTOLINI, S.; MARI, D.; MATTACE, R.; MONTI, D.; MORELLINI, M.; SANSONI, P.; FRANCESCHI, C. DNA multiallelic systems reveal gene/longevity associations not detected by diallelic systems. The APOB locus. **Hum. Genet.**, v.99, p.312-318, 1997.

BENN, M.; NORDESTGAARD, B.G.; JENSEN, J.S.; GRANDE, P.; SILLESEN, H.; TYBJAERG-HANSEN, A. Polymorphism in APOB associated with increased LDL

levels in both genders in the general population. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.90, p. 5797-803, 2005.

BERNARD, S.; CHARRIERE, S.; CHARCOSSET, M.; BERTHEZENE, F.; MOULIN, P.; SASSOLAS, A. Relation between XbaI apolipoprotein B gene polymorphism and cardiovascular risk in a type 2 diabetic cohort. **Atherosclerosis**, v.175, p. 177-181, 2004.

BOEKHOLDT, S.M.; PETERS, R.J.; FOUNTOULAKI, K.; KASTELEIN, J.J.; SIJBRANDS, E.J. Molecular variation at the apolipoprotein B gene locus in relation to lipids and cardiovascular disease: a systematic meta-analysis. **Hum. Genet.**, v.113, p. 417-425, 2003.

BOHN, M; BERG, K. The *XbaI* polymorphism at the apolipoprotein B locus and risk of atherosclerotic disease. **Clin. Genet.**, v.46, p. 77-79, 1994.

BOSSE, Y.; PERUSSE, L.; VOHL, M.C. Genetics of LDL particle heterogeneity: from genetic epidemiology to DNA – base variation. **J. Lipid Res.**, v.45, p. 1008-1026, 2004.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Receptor mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v.76, p.3330-3337, 1979.

BYDLOWSKI, S.P.; NOVAK, E.M.; ISSA, J.S.; FORTI, N.; GIANNINI, S.D.; DIAMENT, J. DNA polymorphisms of apolipoprotein B and AI-CII-AIV genes in a Brazilian population: a preliminary report. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p. 1269-1274, 1996.

CARMENA, R; DURIES, P; FRUCHART, J-C. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. **Circulation**, v.109, s.III, p.2-7, 2004.

CARR, M.C; BRUNZELL, J.D. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p. 2601-2607, 2004.

CASTELLI, W.P.; GARRISON, R.J.; WILSON, P.W.; ABBOTT, R.D.; KALOUSDIAN, S.; KANNEL, W.B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. **JAMA**, v.256, p. 2835-2838, 1986.

CAVALLI, S.A.; HIRATA, M.H.; SALAZAR, L.A.; DIAMENT, J.; FORTI, N.; GIANNINI, S.D.; NAKANDAKARE, E.R.; BERTOLAMI, M.C.; HIRATA, R.D. Apolipoprotein B gene polymorphisms: prevalence and impact on serum lipid

concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil. **Clin. Chim. Acta**, v.302, p. 189-203, 2000.

CHAER, R.A.; BILLEH, R.; MASSAD, M.G. Genetics and gene manipulation therapy of premature coronary artery disease. **Cardiology**, v.101, p. 122-130, 2004.

CHAUFFERT, M.; LARGHERO, J.; NGOHOU-BOTUM, K.; CISSE, A.; CHEVENNE, D.; TRIVIN, F. DNA polymorphisms of apolipoprotein B in the population of Senegal. **Am. Hum. Genet.**, v.61, p. 525-529, 1997.

CHEN, S-H.; HABIB, E.; YANG, C.Y.; GU, Z.W.; LEE, B.R.; WENG, S.A.; SILBERMAN, S.R.; CAI, S.J.; DESLYPERE, J.P.; ROSSENEU, M. *et al.* Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. **Science**, Washington, v.238, p. 363-366, 1987.

CHIODINI, B.D. ; BARLERA, S.; FRANZOSI, M.G.; BECEIRO, V.L.; INTRONA, M.; TOGNONI, G. Apo B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. **Atherosclerosis**, v.167, p. 355-366, 2003.

COOPER, M.E. Importance of advanced glycation end products in diabetes-associated cardiovascular and renal disease. **Am. J. Hypertens.**, v.17, p. 31S-38S, 2004.

CORBO, R.M.; VILARDO, T.; MANTUANO, E.; RUGGERI, M.; GEMMA, A.T.; SCACCHI, R. Apolipoproteins B and E, and angiotensin I-converting enzyme (ACE) genetic polymorphisms in Italian women with coronary artery disease (CAD) and their relationships with plasma lipid and apolipoprotein levels. **Clin. Genet.**, v.52, n.2, p. 77-82, 1997.

CORBO, R.M.; SCACCHI, R.; RICKARDS, O.; MARTINEZ-LABARGA, C.; DE STEFANO, G.F. An investigation of human apolipoproteins B and E polymorphisms in two African population from Ethiopia and Benin. **Am. J. Hum. Biol.**, v.11, n.3, p.297-304.

DE PÁDUA MANSUR, A.; ANNICCHINO-BIZZACCHI, J.; FAVARATO, D.; AVAKIAN, S.D.; MACHADO CESAR, L.A.; FRANCHINI RAMIRES, J.A. Angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein B polymorphism in coronary artery disease. **Am. J. Cardiol.**, v.85, p. 1089-1093, 2000.

DELGHANDI, M.; THANGARAJAH, R.; NILSEN, M.; GRIMSGAARD, S.; BONAA, K.H.; TONSTAD, S.; JORGENSEN, L. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene (*Xba*I, *Eco*RI, and *Msp*I RFLPs) in Norwegians at risk of atherosclerosis and healthy controls. **Acta Cardiol**, v.54, p. 215-225, 1999.

Diretrizes de Doença Coronariana Crônica Angina Estável. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.83, suplemento II, 2004. p. 17-18.

DUNNING, A.M.; RENGES, H.H.; HAMSTEN, A.; TALMUD, P.; HUMPHRIES, S. A postulated phylogenetic tree for the human apolipoprotein B gene: unpredicted haplotype are associated with elevated apo B levels. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1165, p. 271-278, 1993.

EXCOFFIER, L.; SCHNEIDER, S. **Arlequin: ver. 3.0**: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern, 2005. Disponível em <<http://anthro.unige.ch/arlequin/>> Acesso em: 01 nov 2005.

FORTI, N.; SALAZAR, L.A.; DIAMENT, J.; GIANNINI, S.D.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D. Genetic changes and cholesterolemia: new Brazilian studies. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.80, p. 565-571, 2003.

FRANCKE, S.; MANRAJ, M.; LACQUEMANT, C.; LECOEUR, C.; LEPRÊTRE, F.; PASSA, P.; HEBE, A.; CORSET, L.; YAN, S.L.K.; LAHMIDI, S.; JANKEE, S.; GUNNESS, T.K.; RAMJUTTUN, U.S.; BALGOBIN, V.; DINA, C.; FROGUEL, P. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27. **Hum. Mol. Genet.**, v.10, p. 2751-2765, 2001.

FRUCHART, J.-C.; NIERMAN, M.C.; STROES, E.S.G.; KASTELEIN, J.J.P.; DURIEZ, P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. **Circulation**, v.109, p. 15S-19S, 2004.

GENEST, J.J. JR.; ORDOVAS, J.M.; MCNAMARA, J.R.; ROBBINS, A.M.; MEADE, T.; COHN, S.D.; SALEM, D.N.; WILSON, P.W.; MASHARANI, U.; FROSSARD, P.M. *et al.* DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in patients with premature coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.82, p. 7-17, 1990.

HANSEN, P.S.; GERDES, L.U.; KLAUSEN, I.C.; GREGERSEN, N.; FAERGEMAN, O. Polymorphisms in the apolipoprotein B-100 gene contributes to normal variation in plasma lipids in 464 Danish men born in 1948. **Hum. Genet.**, v.91, p. 45-50, 1993.

HAWKINS, M.A. Markers of increased cardiovascular risk: are we measuring the most appropriate parameters? **Obesity Research**, v.12, p. 107S-114S, 2004.

HOMMA, Y. Predictors of atherosclerosis. **J. Atheroscler. Thromb.**, v.11, p. 265-270, 2004.

HONG, S.H.; SONG, J.; KIM, J.Q. The haplotype analyses using multiple markers of the apolipoprotein B gene in patients with coronary artery disease. **J. Korean Med. Sci.**, v.16, p. 719-724, 2001.

HUMPHRIES, S.E. DNA polymorphisms of the apolipoprotein genes – their use in the investigation of genetic component of hyperlipidaemia in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.72, p. 89-108, 1988.

IOANNIDIS, J.P.A.; NTZANI, E.E.; TRIKALINOS, T.A.; CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D.G. Replication validity of genetic association studies. **Nat. Genet.**, v.29, p. 306-309, 2001.

IZAR, M.C.; FONSECA, F.A.; IHARA, S.S.; KASINSKI, N.; SANG, W.H.; LOPES, I.E.; PINTO, L.E.; RELVAS, W.G.; LOURENÇO, D.; TUFIK, S.; DE PAOLA, A.A.; CARVALHO, A.C. Risk factors, biochemical markers, and genetic polymorphisms in early coronary artery disease. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 80, p. 388-395, 2003.

KNOTT, T.J.; PEASE, R.J.; POWELL, L.M.; WALLIS, S.C.; RALL, S.C. JR; INNERARITY, T.L.; BLACKHART, B.; TAYLOR, W.H.; MARCEL, Y.; MILNE, R.; JOHNSON, D.; FULLER, M.; LUSIS, A.J.; MCCARTHY, B.J.; MAHLEY, R.W.; LEVY-WILSON, B.; SCOTT, J. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. **Nature**, v.323, p.734-738, 1986.

KRAUSS, R.M. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.27, p. 1496-1504, 2004.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p. 5444, 1991.

LEVY, A.P. Genetics of diabetic cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. **Acta Diabetol**, v.40, p. S330-333, 2003.

LUSIS, A.J. Genetic factors affecting blood lipoproteins: the candidate gene approach. **J. Lipid Res.**, v.29, p. 397- 492, 1986.

MACHADO, M.O.; HIRATA, M.H.; BERTOLAMI, M.C.; HIRATA, R.D.C. Apo B gene haplotype is associated with lipid profile of higher risk for coronary artery disease in Caucasian Brazilian men. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.15, p. 19-24, 2001.

MCCARTHY, M.I. Progress in defining the molecular basis of type 2 diabetes mellitus through susceptibility-gene identification. **Hum. Mol. Genet.**, v.13, p. 33-41, 2004.

MILLER, M. P. **RxC**: A program for the analysis of contingency tables. 1997. Disponível em: http://www.marksgeneticsoftware.net/_vti_bin/shtml.exe/rxc.htm. Acesso em: 01 nov 2005.

Ministério da Saúde – Brasil. Secretaria Executiva. DATASUS. Indicadores de Morbidade e Fatores de Risco. Taxa de prevalência de diabete melito. Disponível em : < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idx2004/d10.htm> Acesso em : 21 nov 2005.

MISRA, A.; NISHANTH, S.; PASHA, S.T.; PANDEY, R.M.; SETHI, P.; RAWAT, D.S. Relationship of *Xba*I and *Eco*RI polymorphisms of apolipoprotein-B gene to dyslipidemia and obesity in Asian Indians in North India. **Indian Heart J**, v.53, p. 177-183, 2001.

MONSALVE, M.V.; YOUNG, R.; JOBSIS, J.; WISEMAN, S.A.; DHAMU, S.; POWELL, J.T.; GREENHALGH, R.M.; HUMPHRIES, S.E. DNA polymorphisms of the gene for apolipoprotein B in patients with peripheral arterial disease. **Atherosclerosis**, v.70, p. 123-129, 1988.

MYANT, N.B.; GALLAGHER, J.; BARBIR, M.; THOMPSON, G.R.; WILE, D.; HUMPHRIES, S.E. Restriction fragment length polymorphisms in the apo B gene in relation to coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.77, p. 193-201, 1989.

NIEMINEN, M.S.; MATTILA, K.J.; AALTO-SETÄLÄ, K.; KUUSI, T.; KONTULA, K.; KAUPPINEN-MAKELIN, R.; EHNHOLM, C.; JAUHIAINEN, M.; VALLE, M.; TASKINEN, M.R. Lipoproteins and their genetic variation in subjects with and without angiographically verified coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb.**, v.12, p. 58-69, 1992.

NORDLIE, M.A.; WOLD, L.E.; KLONER, R.A. Genetic contributors toward increased risk for ischemic heart disease. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.39, p.667-679, 2005.

PAN, J.; CHIANG, A.; TAI, J.J.; WANG, S.; CHANG, M. Restriction fragment length polymorphisms of apolipoprotein B gene in Chinese population with coronary heart disease. **Clin. Chem.**, v.41, p. 424-429, 1995.

PRIESTLEY, L.; KNOTT, T.; WALLIS, S.; POWELL, L.; PEASE, R.; BRUNT, H.; SCOTT, J. RFLP for the human apolipoprotein B gene: *Xba*I. **Nucleic Acids Res.**, v.13, p. 6793, 1985.

PURI, R.D.; TEWARI, S.; SINHA, N.; RAMESH, V.; KHAN, F.; SINGH, V.P.; AGRAWAL, S. Polymorphisms in the apolipoprotein B-100 gene: association with plasma lipid concentration and coronary artery disease. **Indian Heart J**, v.55, p. 60-64, 2003.

RABELO, L.M.; RABELO, M.M.; MARTINEZ, T.L.R. Diabetes e dislipidemias. MARTINEZ, T.L.R. **Manual de condutas clínicas em dislipidemias**. Rio de Janeiro: Medline, 2003. p. 271-277.

RABELO, L.M.; COUTO-SILVA, A.C.; PEREIRA, A.; MARTINEZ, T.L.R.; FISBERG, M. Dislipidemias na infância e na adolescência. MARTINEZ, T.L.R.

Manual de condutas clínicas em dislipidemias. Rio de Janeiro: Medline, 2003a. p. 221-233.

RÉGIS-BAILLY, A.; VISVIKIS, S.; STEINMETZ, J.; FELDMANN, L.; BRIANCON, S.; DANCHIN, N.; ZANNAD, F.; SIEST, G. Frequencies of five genetic polymorphisms in coronarographed patients and effects on lipid levels in a supposedly healthy population. **Clin. Genet.**, v.50, p. 339-347, 1996.

RENGES, H.H.; WILE, D.B.; MCKEIGUE, P.M.; MARMOT, M.G.; HUMPHRIES, S.E. Apolipoprotein B gene polymorphisms are associated with lipid levels in men of South Asian descent. **Atherosclerosis**, v.91, p. 267-275, 1991.

RENGES, H.H.; PEACOCK, R.; DUNNING, A.M.; TALMUD, P.; HUMPHRIES, S.E. Genetic relationship between the 3'VNTR and diallelic apolipoprotein B gene polymorphisms: haplotype analysis in individuals of European and South Asian origin. **Ann. Hum. Genet.**, v.56, p. 11-33, 1992.

ROSEGREN, A.; WELIN, L.; TSIPOGIANNI, A.; WILHELMSEN, L. Impact of cardiovascular risk factors on coronary heart disease and mortality among middle age diabetic men. A general population study. **BMJ**, v.299, p.1127-1131, 1989.

SACKS, DB.; BRUNS, D.E.; GOLDSTEIN, D.E.; MACLAREN, N.K.; McDONALD, J.M.; PARROTT, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin. Chem.**, v.48, p. 436-472, 2002.

SAHA, N.; TONG, M.C.; TAY, J.S.H.; JEYASEELAN, K.; HUMPHRIES, S.E. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in Chinese coronary artery disease patients. **Clin. Genet.**, v.42, p. 164-170, 1992.

SAKUMA, T.; HIRATA, R.D.; HIRATA, M. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.18, p.309-316, 2004.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; GIANNINI, S.D.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; LIMA, T.M.; HIRATA, R.D. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. **Clin. Chim. Acta**, v.300, p. 139-149, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning - A laboratory manual. 2 ed. New York : CSH, 1989.

SANKARANARAYANAN, K.; CHAKRABORTY, R.; BOERWINKLE, E.A. Ionizing radiation and genetic risks. VI. Chronic multifactorial diseases: a review of

epidemiological and genetical aspects of coronary heart disease, essential hypertension and diabetes mellitus. **Mutat. Res.**, v.436, p. 21-57, 1999.

SCARTEZINI, M.; ZAGO, M.A.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PAZIN-FILHO, A.; MARIN-NETO, J.A.; HOTTA, J.K.; NASCIMENTO, A.J.; DOS-SANTOS, J.E. The X-X-/E+E+ genotype of the XbaI/EcoRI polymorphisms of the apolipoprotein B gene as a marker of coronary artery disease in a Brazilian sample. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, p. 369-375, 2003.

SEGREST, J.P.; JONES, M.K.; DE LOOF, H.; DASHTI, N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. **J. Lipid Res.**, v.42, p. 1346-1367, 2001.

SHARMA, S.B.; DWIVEDI, S.; PRABHU, K.M.; SINGH, G.; KUMAR, N.; LAI, M.K. Coronary risk variables in young asymptomatic smokers. **Indian J. Med. Res.**, v.122, p. 205-210, 2005.

SHIMOKATA, K.; YAMADA, Y.; KONDO, T.; ICHIHARA, S.; IZAWA, H.; NAGATA, K.; MUROHARA, T.; OHNO, M.; YOKOTA, M. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in individuals with or without nonfamilial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.172, p. 167-173, 2004.

SNIDERMAN, A.D.; FURBERG, C.D.; KEECH, A.; ROETERS VAN LENNEP, J.E.; FROHLICH, J.; JUNGNER, I.; WALLDIUS, G. Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. **Lancet**, v.361, p. 777-780, 2003.

SNIDERMAN, A.D.; ROSENBLOOM, M. If apo B is so good, why isn't everybody measuring it? **Neth J Med**, v.63, p. 232-235, 2005.

SOUTAR, A.K.; NAOUMOVA, R.P.; TRAUB, L.M. Genetics, clinical phenotype, and molecular cell biology of autosomal recessive hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.23, p. 1963-1970, 2003.

STAMLER, J.; VACCARO, O.; NEATON, J.D.; WENTWORTH, D. Diabetes and other risk factors-12 year cardiovascular mortality from the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes Care**, v.16, p. 434-444, 1993.

STEPANOV, V.A.; PUZYREV, V.P.; KARPOV, R.S.; KUTMIN, A.I. Genetic markers in coronary artery disease in a Russian population. **Hum. Biol.**, v.70, p. 47-57, 1998.

TAHRI-DAIZADEH, N.; TREGOUET, D.A.; NICAUD, V.; POIRIER, O.; CAMBIEN, F.; TIRET, L. Exploration of multilocus effects in a highly polymorphism

gene, the apolipoprotein (APOB) gene, in relation to plasma apoB levels. **Ann. Hum. Genet.**, v.68, p. 405-418, 2004.

TAKAISHI, H.; TANIGUCHI, T.; FUJIOKA, Y.; ISHIKAWA, Y.; YOKOYAMA, M. Impact of increasing diabetes on coronary artery disease in the past decade. **J. Atheroscler. Thromb.**, v.11, p. 271-277, 2004.

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T.; HANEFELD, M. The lipid triad in type 2 diabetes - prevalence and relevance of hypertriglyceridaemia/low high-density lipoprotein syndrome in type 2 diabetes. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v.112, p. 75-79, 2004.

The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v.409, p. 929-933, 2001 [www.nature.com].

TURNER, P.R.; TALMUD, P.J.; VISVIKIS, S.; EHNHOLM, C.; TIRET, L. DNA polymorphisms of the apoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with perceived risk of cardiovascular disease: European Atherosclerosis Research Study. **Atherosclerosis**, v.116, p. 221-234, 1995.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. **Human genetics**: problems and approaches. 3^a ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 851 p.

WÄGNER, A. M.; PÉREZ, A.; ZAPICO, E.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B in the dyslipidemic classification of type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v.26, p. 2048-2051, 2003.

WHITFIELD, A.J.; BARRETT, P.H.; VAN BOCKXMEER, F.M.; BURNETT, JR. Lipid disorders and mutations in the apo B gene. **Clin. Chem.**, v.50, p. 1725-1732, 2004.

WHO – World Health Organization. The World Health Report, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/en/whr2002_annex2.pdf> Acesso em: 27 jun 2004.

YANG, C.Y.; CHEN, S.H.; GIANTURCO, S.H.; BRADLEY, W.A.; SPARROW, J.T.; TANIMURA, M.; LI, W.H.; SPARROW, D.A.; DELOOF, H.; ROSSENEU, M.; LEE, F.S.; GU, Z.W.; GOTTO, A.M.; CHAN, L. Sequence, structure, receptor binding domains, and internal repeat of human apolipoprotein B-100. **Nature**, v.323, p. 738-742, 1986.

YE, P.; BAOSHENG, C.; WANG, S. Association of polymorphisms of the apolipoprotein B gene with coronary heart disease in Han Chinese. **Atherosclerosis**, v.117, p. 43-50, 1995.

ANEXOS

ANEXO I – FICHA DE COLETA DE DADOS DO PACIENTE

| Caracterização do Paciente | Nº registro interno | Data |
|----------------------------|---------------------|----------------|
| Nome: | | ____/____/____ |

Dados clínicos

| N | Dados | Observações |
|----|--|--|
| 1 | Sexo | (1) = Masculino (2) = Feminino |
| 2 | Idade | [] anos |
| 3 | Peso | [] kg |
| 4 | Altura | [] cm |
| 5 | IMC | Não preencher |
| 6 | Pressão Arterial (PA) | [] / [] mmHg |
| 7 | Tabagismo | (1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante |
| 8 | <i>Diabetes mellitus</i> | (1) = Sim (2) = Não Tipo do diabetes: (1) = Tipo 1; (2) = Tipo 2; (3) = outro Tempo do diagnóstico do <i>Diabetes mellitus</i> : [] anos |
| 09 | História familiar de Doença Arterial Coronária (DAC) | Pelo menos um parente de primeiro grau foi diagnosticado com DAC até os 55 anos (homens) ou até 65 anos (mulheres) (1) = Sim; (2) = Não |
| 10 | História clínica | Insuficiência Renal: (1) = Sim (2) = Não Tempo da doença: [] anos Infarto: (1) = Sim (2) = Não Tempo de ocorrência do evento: []/(meses) ou (anos) Anotar outros dados relevantes: |
| 11 | Medicamentos: | Hipoglicemiantes: (1) = Sim; (2) = Não Quais: b) Hipolipemiantes: (1) = Sim; (2) = Não Quais: c) Anti-hipertensivos: (1) = Sim; (2) = Não Quais: Outros: |
| 12 | Dados do cateterismo | Não é necessário preencher |

ANEXO II – SEQUÊNCIA DE BASES DO DNA DO EXON 26 DO GENE DA APO B

GenBank N° AH003569 [Human apolipoprotein B-100 (apoB) gene]

Exon 26: nucleotídeos 3412 – 10983

O início e o final do exon estão identificados em letra azul e setas em negro. A sequência amplificada (710 bp) em destaque e marcada em negrito. O sítio de anelamento dos iniciadores está marcado em vermelho. O sítio de restrição da enzima *XbaI* está identificado com (↓) e o nucleotídeo mutado entre parênteses.

→

```

3361 tctggaaatg tactgcttaa ttttaaccaat gtcttttcat ttttatgtta ggatctggag
3421 aaacaacata tgaccacaag aatacgttca cactatcatg tgatgggtct ctacgccaca
3481 aattttctaga ttcgaatatc aaattcagtc atgtagaaaa acttggaac aaccagctct
3541 caaaagggtt actaatattc gatgcatcta gttcctggg accacagatg tctgcttcag
3601 ttcatTTTgga ctccaaaaag aaacagcatt tgTTTgtcaa agaagtcaag attgatgggc
3661 agttcagagt ctcttcgttc tatgctaaag gcacatatgg cctgtcttgt cagagggatc
3721 ctaacactgg cgggtcaat ggagagtcca acctgagggt taactcctcc tacctccaag
3781 gcaccaacca gataacagga agatatgaag atggaaccct ctccctcacc tccacctctg
3841 atctgcaaag tggcatcatt aaaaatactg cttccctaaa gtatgagaac tacgagctga
3901 ctttaaaatc tgacaccaat gggaagtata agaactttgc cacttctaac aagatggata
3961 tgaccttctc taagcaaaat gcactgctgc gttctgaata tcaggctgat tacgagctat
4021 tgaggTtctt cagcctgctt tctggatcac taaattccca tggTcttgag ttaaagtctg
4081 acatcttagg cactgacaaa attaatagtg gtgctcaca ggcgacata aggattggcc
4141 aagatggaaT atctaccagt gcaacgacca acctgaagtg tagtctctcg gtgctggaga
4201 atgagctgaa tgcagagctt ggctctctcg gggcatctat gaaattaaca acaaatggcc
4261 gcttcaggga acacaatgca aaattcagtc tggatgggaa agccgccctc acagagctat
4321 cactgggaag tgcttatcag gccatgattc tgggtgtcga cagcaaaaac attttcaact
4381 tcaaggtcag tcaagaagga cttaagctct caaatgacat gatgggctca tatgctgaaa
4441 tgaattttga ccacacaaac agtctgaaca ttgcaggctt atcactggac ttctcttcaa
4501 aacttgacaa catttacagc tctgacaagt ttataagca aactgttaat ttacagctac
4561 agccctattc tctggttaact actttaaaca gtgacctgaa atacaatgct ctggatctca
4621 ccaacaatgg gaaactacgg ctagaacccc tgaagctgca tgtggctggt aacctaaaag
4681 gagcctacca aaataatgaa ataaaacaca tctatgccat ctcttctgct gccttatcag
4741 caagctataa agcagacact gttgctaagg ttcagggtgt ggagtttagc catcggtca
4801 acacagacat cgctgggctg gcttcagcca ttgacatgag caaaaactat aattcagact
4861 cactgcattt cagcaatgtc ttccgttctg taatggcccc gtttaccatg accatcgatg
4921 cacatacaaa tggcaatggg aaactcgctc tctggggaga acatactggg cagctgtata
4981 gcaaatctct gttgaaagca gaacctctgg catttacttt ctctcatgat taaaaaggct
5041 ccacaagtca tcatctcgtg tctaggaaaa gcatcagtgC agctcttgaa cacaaagtca
5101 gtgccctgct tactccagct gagcagacag gcacctgaa actcaagacc caatttaaca
5161 acaatgaata cagccaggac ttggatgctt acaacactaa agataaaaatt ggcgtggagc
5221 ttactggagc aactctggct gacctaatc tactagactc cccaattaaa gtgccacttt
5281 tactcagtga gccatcaat atcattgatg ctttagagat gagagatgac gttgagaagc
5341 cccaagaatt tacaattgtt gcttttgtaa agtatgataa aaaccaagat gttcactcca
5401 ttaacctccc attttttgag accttgcaag aatattttga gaggaatcga caaaccatta
5461 tagttgtact ggaaaacgta cagagaaacc tgaagcacat caatattgat caatttgtaa
5521 gaaaatacag agcagccctg ggaaaactcc cacagcaagc taatgattat ctgaattcat
5581 tcaattggga gagacaagtt tcacatgcca aggagaaact gactgctctc aaaaaaagt
5641 atagaattac agaaaatgat atacaaattg cattagatga tgccaaaatc aactttaatg
5701 aaaaactatc tcaactgcag acatatatga tacaatttga tcagtataat aaagatagtt
5761 atgatttaca tgatttgaaa atagctattg ctaatattat tgatgaaatc attgaaaaat
5821 taaaaagtct tgatgagcac tatcatatcc gtgtaaattt agtaaaaaaca atccatgatc
5881 tacatttggt tattgaaaat attgatttta acaaaagtgg aagtagtact gcatcctgga
5941 ttcaaaatgt ggatactaag taccaaatca gaatccagat acaagaaaaa ctgcagcagc
6001 ttaagagaca catacagaat atagacatcc agcacctagc tggaaagtta aaacaacaca
6061 ttgaggctat tgatgtttag gtgcttttag atcaattggg aactacaatt tcatttgaaa
6121 gaataaatga cgttcttgag catgtcaaac actttgttat aaatcttatt ggggattttg
6181 aagtagctga gaaaatcaat gccttcagag ccaaagtcca tgagttaatc gagaggtatg
6241 aagtagacca acaaatccag gttttaatgg ataaattagt agagttggcc caccaataca

```

6301 agttgaa lgga gactattcag aagctaagca atgtcctaca acaagttaag ataaaagatt
 6361 actttgagaa attggttgga tttattgatg atgctgtcaa gaagcttaat gaattatctt
 6421 ttaaaacatt cattgaagat gttacaaat tcttgacat gttgataaag aaattaaagt
 6481 catttgatta ccaccagttt gtagatgaaa ccaatgacaa aatccgtgag gtgactcaga
 6541 gactcaatgg tgaaattcag gctctggaac taccacaaaa agctgaagca ttaaaactgt
 6601 ttttagagga aaccaaggcc acagttgcag tgtatctgga aagcctacag gacacaaaa
 6661 taaccttaat catcaattgg ttacaggagg ctttaagttc agcatctttg gtcacatga
 6721 aggccaaatt ccgagagacc (t)↓ctagaagata cacgagaccg aatgtatcaa atggacattc
 6781 agcaggaact tcaacgatac ctgtctctgg taggccaggt ttatagcaca cttgtcacct
 6841 acatttctga ttggtggact cttgctgcta agaaccttac tgactttgca gagcaatatt
 6901 ctatccaaga ttgggctaaa cgtatgaaag cattggtaga gcaagggttc actgttctcg
 6961 aaatcaagac catccttggg accatgcctg cctttga agt cagtcttcag gctcttcaga

 7021 aagctacctt ccagacacct gattttatag tccccctaac agatttgagg attccatcag
 7081 ttcagataaa cttcaaagac ttaaaaaata taaaaatccc atccaggttt tccacaccag
 7141 aattttacat ccttaacacc ttccacattc cttcctttac aattgacttt gtagaaatga
 7201 aagtaaagat catcagaacc attgaccaga tgctgaacag tgagctgcag tggcccgttc
 7261 cagatatata tctcagggat ctgaaggtag aggacattcc tctagcgaga atcacctgc
 7321 cagacttccg tttaccagaa atcgcaattc cagaattcat aatcccaatc ctcaacctta
 7381 atgattttca agttcctgac cttcacatac cagaattcca gcttccccac atctcacaca
 7441 caattgaagt acctactttt ggcaagctat acagtattct gaaaatccaa tctcctcttt
 7501 tcacattaga tgcaaatgct gacataggga atggaaccac ctacagcaaac gaagcaggtta
 7561 tcgcagcttc catcactgcc aaaggagagt ccaaattaga agttctcaat tttgattttc
 7621 aagcaaatgc acaactctca aaccctaaga ttaatccgct ggctctgaag gagtcatgta
 7681 agttctccag caagtacctg agaacggagc atgggagtga aatgctgttt ttggaaatg
 7741 ctattgaggy aaaatcaaac acagtggcaa gtttacacac agaaaaaaat acactggagc
 7801 ttagtaatgg agtgattgtc aagataaaca atcagcttac cctggatagc aacactaaat
 7861 acttccacaa attgaacatc cccaaactgg acttctctag tcaggctgac ctgacgaacg
 7921 agatcaagac actggttgaaa gctggccaca tagcatggac ttcttctgga aaagggtcat
 7981 ggaaatgggc ctgccccaga ttctcagatg agggaaacaca tgaatcaca attagtttca
 8041 ccatagaagg accctcact tcttttgac tgtccaataa gatcaatagc aaacacctaa
 8101 gagtaaacca aaacttggtt tatgaatctg gctccctcaa cttttctaaa cttgaaattc
 8161 aatcacaaat cgattcccag catgtgggccc acagtgttct aactgctaaa ggcattggc
 8221 tgtttgagga aggggaaggca gagtttactg ggaggcatga tgctcattta aatggaaagg
 8281 ttattggaac tttgaaaaat tctcttttct ttccagccca gccatttgag atcacggcat
 8341 ccacaaacaa tgaagggaat ttgaaagttc gttttccatt aagggttaaca gggaagatag
 8401 acttctctgaa taactatgca ctgtttctga gtcccagtc ccagcaagca agttggcaag
 8461 taagtgttag gttcaatcag tataagtaca accaaaattt ctctgctgga aacaacgaga
 8521 acattatgga ggcccatgta ggaataaatg gagaagcaaa tctggatttc ttaaacattc
 8581 ctttaacaat tctgaaatg cgtctacctt acacaataat cacaactcct ccactgaaag
 8641 atttctctct atgggaaaaa acaggcttga aggaattctt gaaaacgaca aagcaatcat
 8701 ttgattttaag tgtaaaagct cagtataaga aaaacaaaaca caggcattcc atcacaaatc
 8761 ctttggtctgt gctttgtgag tttatcagtc agagcatcaa atcctttgac aggcattttg
 8821 aaaaaaacag aaacaatgca ttagattttg tcaccaaatc ctataatgaa acaaaaatta
 8881 agtttgataa gtacaaagct gaaaaatctc acgacgagct cccaggacc tttcaaatc
 8941 ctggatacac tgttccagtt gtcaatgttg aagtgtctcc attcaccata gagatgtcgg
 9001 cattcggcta tgtgttccca aaagcagtc gcatgcctag tttctccatc ctaggttctg
 9061 acgtccgtgt gccttcatac acattaatcc tgccatcatt agagctgcca gtccctcatg
 9121 tccctagaaa tctcaagctt tctcttccag atttcaagga attgtgtacc ataagccata
 9181 tttttattcc tgccatgggc aatattacat atgatttctc ctttaaatca agtgtcatca
 9241 actgaatac caatgctgaa ctttttaacc agtcagatat tgttgctcat ctcctttctt
 9301 catcttcac tgctattgat gcaactgcag acaaattaga gggcaccaca agattgacaa
 9361 gaaaaagggg attgaagtta gccacagctc tgtctctgag caacaaattt gtggagggtta
 9421 gtcataacag tactgtgagc ttaaccacga aaaatatgga agtgtcagtg gcaacaacca
 9481 caaaagccca aattccaatt ttgagaatga atttcaagca agaacttaat ggaaatacca
 9541 agtcaaaacc tactgtctct tctccatgg aatttaagta tgatttcaat tcttcaatgc
 9601 tgtactctac cgctaaagga gcagttgacc acaagcttag cttggaaagc ctcacctctt
 9661 acttttccat tgagtcactc accaaaggag atgtcaaggg ttcggttctt tctcggaat
 9721 attcaggaac tattgctagt gaggccaaca cttacttgaa ttccaagagc acacggtctt
 9781 cagtgaagct gcagggcact tccaaaattg atgatatctg gaaccttgaa gtaaaagaaa
 9841 attttgctgg agaagccaca ctccaacgca tatattccct ctgggagcac agtacgaaaa
 9901 accacttaca gctagagggc ctctttttca ccaacggaga acatacaagc aaagccacc
 9961 tggaactctc tccatggcaa atgtcagctc ttgttcaggt ccatgcaagt cagcccagtt
 10021 ccttccatga tttccctgac cttggccagg aagtggcctt gaatgctaac actaagaacc
 10081 agaagatcag atggaaaaat gaagtcaggga ttcattctg gtccttccag agccaggtcg


```

10141 agctttccaa tgaccaagaa aaggcacacc ttgacattgc aggatcctta gaaggacacc
10201 taagggttcct caaaaatatc atcctaccag tctatgacaa gagcttatgg gatttcctaa
10261 agctggatgt aaccaccagc attggttagga gacagcatct tcgtgtttca actgcctttg
10321 tgtacaccaa aaaccccaat ggctattcat tctccatccc tgtaaaagtt ttggctgata
10381 aattcattat tcctgggctg aaactaaatg atctaaattc agttcttgtc atgcctacgt
10441 tccatgtccc atttacagat cttcaggttc catcgtgcaa acttgacttc agagaaatac
10501 aaatctataa gaagctgaga acttcatcat ttgccctcaa cctaccaaca ctccccgagg
10561 taaaattccc tgaagttgat gtgttaacaa aatattctca accagaagac tccttgattc
10621 ccttttttga gataaccgtg cctgaatctc agttaactgt gtcccagttc acgcttccaa
10681 aaagtgtttc agatggcatt gctgctttgg atctaaatgc agtagccaac aagatcgag
10741 actttgagtt gccaccatc atcgtgcctg agcagaccat tgagattccc tccattaagt
10801 tctctgtacc tgctggaatt gtcattcctt cctttcaagc actgactgca cgctttgagg
10861 tagactctcc cgtgtataat gccacttgga gtgccagttt gaaaaacaaa gcagattatg
10921 ttgaaacagt cctggattcc acatgcagct caaccgtaca gttcctagaa tatgaactaa
10981 atgtaagaa atatcctgcc tcctctccta gatactgtat attttcaatg agagttatga

```



12721 tctgttttagt **cc**tctccaga taaaaaactc accatatcca aaactgagtt gagggtcggg
 12781 gaatctgatg aggaaactca gatcaaagtt aattgggaag aagaggcagc ttctggcttg
 12841 ctaacctctc tgaaagacaa cgtgcccaag gccacagggg tcctttatga ttatgtcaac

12901 aagtaccact gggaacacac agggctcacc lctgagagaag tgtcttcaaa gctgagaaga
 12961 aatctgcaga acaatgctga gtgggtttat caagggggcca ttaggcaaat tgatgatatac
 13021 gacgtgaggt tcagaaagc agccagtggc accactggga cctaccaaga gtggaaggac
 13081 aaggcccaga atctgtacca ggaactgttg actcaggaag gccaaagccag tttccaggga
 13141 ctcaaggata acgtgtttga tggtttgga cgagttactc aag(a)↓aattcca tatgaaagtc
 13201 aagcatctga ttgaactact cattgatttt ctgaacttcc ccagattcca gtttccgggg
 13261 aaacctggga tatacactag ggaggaactt tgcactatgt tcataaggga ggttagggacg
 13321 gtactgtccc aggtatatctc gaaagtcctaat atgtggtcac aaatactgtt ttcttatctc
 13381 caagaccta g tgattacact tcctttcgag ttaaggaac ataaactaat agatgtaac

13441 tccgatgtata gggaactggt gaaagattta tcaaaagaag cccaagaggt atttaaagcc
 13501 attcagtcctc tcaagaccac agaggtgcta cgtaatcttc aggacctttt acaattcatt
 13561 ttccaactaa tagaagataa cattaaacag ctgaaaagaa tgaaatttacc ttatcttatt
 13621 aattatatcc aagatgagat caacacaatc ttcaatgatt atatcccata tgtttttaa
 13681 ttgttgaaa gaaacctatg ccttaatctt cataagttca atgaatttat tcaaaacgag
 13741 cttcaggaag cttctcaaga gttacagcag atccatcaat acattatggc cttcgtgaa
 13801 gaatattttg atccaagtat agttggctg acagtgaat attatgaact tgaagaaaag
 13861 atagtcagtc tgatcaagaa cctgttagtt gctcttaagg acttccattc tgaatatatt
 13921 gtcagtgcct ctaactttac ttcccacatg tcaagctcaag ttgagcaatt tctgcacaga
 13981 aatatttcagg aatatcttag catccttacc gatccagatg gaaaaggga agagaagatt
 14041 gcagagcttt ctgccactgc tcaggaaata attaaaagcc aggccattgc gacgaagaaa
 14101 ataatttctg attaccacca gcagtttaga tataaactgc aagatttttc agaccaactc
 14161 tctgattact atgaaaaatt tattgctgaa tccaaaagat tgattgacct gtccattcaa
 14221 aactaccaca catttctgat atacatcacg gagttactga aaaagctgca atcaaccaca
 14281 gtcatgaacc cctacatgaa gcttgctcca ggagaactta ctatcatcct **ctaa**ttttt

ANEXO IV – VALORES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISES LABORATORIAIS

| ANALITOS | MNEMÔNICO | VALORES DE REFERÊNCIA | REFERÊNCIAS |
|---|-------------------|---|--|
| Hemoglobina Glicada A_{1c} (%) | HbA _{1c} | 4,5 – 6,5% | Bio Rad – Variant (HPLC) |
| Glicose (mg/dL) | GLU | 60 - 99 | American Diabetes Association, 2005. |
| Colesterol total (mg/dL) | COL | Desejável < 200 Limítrofe 200 - 239 Elevado > 240 | III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias, 2001. |
| HDL-colesterol (mg/dL) | HDL-c | > 40 >45 (diabéticos) > 60 (desejável) | |
| LDL-colesterol (mg/dL) | LDL-C | < 100 Ótimo 100 – 129 Desejável 130 – 159 Limítrofe 160 – 189 Alto ≥ 190 Muito alto | |
| Triglicérides (mg/dL) | TG | < 150 Ótimo 150 – 200 Limítrofe 200 – 499 Alto ≥ 500 Muito alto | |
| Apolipoproteína AI (mg/dL) | apoAI | ♂ 104 - 202 ♀ 108 - 225 | Roche Diagnostics – Hitachi 912 |
| Apolipoproteína B (mg/dL) | apoB | ♂ 66 – 133 ♀ 60 - 117 | |

O princípio do ensaio de hemoglobina glicada A_{1c} (Variant – Bio Rad) pode ser acessado em: www.bio-rad.com/

Os princípios dos ensaios em química seca – glicose, colesterol total e triglicérides (Vitros 750 - Johnson&Johnson) podem ser acessados em: www.orthoclinical.com/Docs/USSearchPage.aspx?Language=ALL

Os princípios dos ensaios de HDL-colesterol e LDL-colesterol e das apolipoproteínas AI e B (Hitachi 912 - Roche Diagnostics) podem ser acessados em: www.roche-diagnostics.com/